

Aus dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit
der Klinik für Orthopädie, Unfallchirurgie und Rheumaorthopädie der
Elisabeth-Klinik Bigge / Olsberg
Ärztlicher Direktor und Geschäftsführer Prof. Dr. Dr. Axel Wilke
und
dem Labor für Experimentelle Orthopädie und Biomechanik
des Fachbereichs Medizin
Direktor: Herr Prof. Dr. David Jones

**Vergleichende in vitro – Analyse
von allogenen Knochentransplantaten
- Telos versus autolog -**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Christoph Herzberger

aus Eutin

Marburg 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg am 26.03.2009

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan:	Prof. Dr. M. Rothmund
Referent:	Prof. Dr. Dr. A. Wilke
1. Korreferent:	PD Dr. A. Burchert
2. Koreffferent:	Prof. Dr. E. Weihe

**Vergleichende in vitro – Analyse
von allogenen Knochentransplantaten
- Telos versus autolog -**

von

Christoph Herzberger

Inhaltsverzeichnis:

I.	Einleitung.....	8
I.1	Die Geschichte der Knochentransplantation.....	8
I.2	Knochentransplantation heute.....	12
I.3	Knochenersatzmaterialien.....	13
I.3.1	Autologe Knochentransplantation.....	13
I.3.2	Allogene Knochentransplantation.....	14
I.3.3	Xenogene Knochentransplantation	14
I.3.4	Künstliche Knochenersatzmaterialien.....	15
I.4	Sterilisation / Desinfektion der allogenen Transplantate	15
I.5	Zellkultur und Tierversuche.....	17
I.6	Knochenstoffwechsel	20
I.7	Fragestellung.....	24
II.	Material und Methoden.....	25
II.1	Versuchsmaterialien.....	25
II.1.1	Geräte	25
II.1.1.1	Laborgeräte.....	25
II.1.1.2	Geräte für Probenschnitt / -bearbeitung und Zubehör.....	26
II.1.1.3	Desinfektion	26
II.1.1.4	Zellkultur	26
II.1.1.5	Analytische Geräte	26
II.1.1.6	Kühlgeräte	27
II.1.2	Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien.....	27
II.1.2.1	Zellkultur	27
II.1.2.2	Interleukin- und Enzymbestimmung	27
II.1.2.3	Färbungen.....	29
II.1.2.4	Desinfektion, Knochenaufbereitung, Knochenmarkspräparation .	29

II.1.2.5	Chemikalien und Puffer.....	29
II.1.2.6	Technoviteinbettung.....	30
II.1.2.7	Verbrauchsmaterialien.....	30
II.1.3	Angesetzte Lösungen und Medien.....	31
II.1.3.1	Zellkultur – Medium.....	31
II.1.3.2	Liqueminhaltiger Phosphatpuffer.....	31
II.1.3.3	Ponal – Lösung.....	31
II.1.3.4	Earles Salt Solution.....	31
II.1.3.5	Wash Buffer für ELISA.....	31
II.1.3.6	Working Detector für ELISA.....	32
II.1.3.7	Substrat Solution für ELISA.....	32
II.2	Patientenausschluss – Hüftkopfgewinnung.....	33
II.3	Versuchsaufbau.....	33
II.4	Herstellung der Knochenprobenkörper.....	36
II.4.1	Präparation der Knochenplättchen.....	36
II.4.2	Aufbereitung der Probenkörper.....	38
II.4.2.1	Telos.....	38
II.4.2.2	Autolog.....	38
II.5	Desinfektionsverfahren.....	39
II.5.1	Telos.....	39
II.6	Zellkultur.....	40
II.6.1	Knochenmarkspräparation.....	40
II.6.2	Kulturbedingungen.....	41
II.6.3	Probenverarbeitung und -lagerung.....	42
II.6.3.1	pH-Bestimmung.....	42
II.6.3.2	Zellzahlmessung.....	42
II.7	Enzymbestimmungen.....	43
II.7.1	Alkalische Phosphatase (AP).....	43
II.7.2	Lactat.....	43
II.7.3	Lactatdehydrogenase (LDH).....	43
II.8	Bestimmung der Zytokine.....	44

II.8.1	Ansetzen der Stock Standards am Beispiel von IL-1 β	44
II.8.2	Ansetzen der Standardverdünnungsreihe am Beispiel von IL-1 β	44
II.8.3	Arbeitsschritte ELISA	44
II.9	Rasterelektronenmikroskopie	46
II.9.1	Knochenplättchen.....	46
II.9.2	Deckgläser mit Zellen	47
II.10	Färbungen.....	47
II.10.1	Giemsa.....	47
II.10.2	Trypan mit Zellzählung.....	48
II.10.3	Basische Fuchsinfärbung	50
II.11	Technoviteinbettung.....	50
II.12	Statistik.....	52
III.	Ergebnisse	55
III.1	Zellkultur ohne Knochenprobenzusatz (Kontrolle)	55
III.2	Zellkultur unter Knochenprobenzusatz.....	56
III.2.1	Zellkultur auf „Telos“-Knochenplättchen.....	56
III.2.2	Zellkultur auf autologen Knochenplättchen.....	58
III.3	pH-Werte während der 12-wöchigen Zellkultur.....	59
III.4	Zellzahlbestimmung über 12 Wochen	62
III.4.1	Trypanfärbung nach 12 Wochen Zellkultur.....	62
III.4.2	Zellzahlbestimmung im abgenommenen Medium.....	62
III.5	Enzymbestimmung der Zellkultur	71
III.5.1	Lactat.....	71
III.5.2	Lactatdehydrogenase (LDH).....	74
III.5.3	Alkalische Phosphatase (AP)	76
III.6	Zytokinprofil der Zellkultur.....	78
III.6.1	Interleukin-1 β (IL-1 β)	79

III.6.2	Interleukin-6 (IL-6)	81
III.6.3	Tumornekrosefaktor- α (TNF α)	83
III.6.4	Interferon- γ (IFN γ)	85
III.7	Rasterelektronische Bilder der Zellkultur nach 12 Wochen	88
III.7.1	Kontrollkultur „nur Zellen“	88
III.7.2	Zellkultur „Telos“	89
III.8	Giemsa-gefärbte Bilder der Zellkultur nach 12 Wochen	93
III.8.1	Kontrollkultur „nur Zellen“	93
III.8.2	Zellkultur „Telos“	94
III.8.3	Zellkultur „autolog“	96
III.9	Schnittbilder nach Technoviteinbettung	97
IV.	Diskussion	98
IV.1	Allgemeine Betrachtungen	98
IV.2	Diskussion der Ergebnisse	100
IV.2.1	pH-Werte und Lactat	100
IV.2.2	Zellzahlen	103
IV.2.2.1	Trypanfärbung	104
IV.2.3	Enzyme	105
IV.2.3.1	Lactatdehydrogenase	105
IV.2.3.2	Alkalische Phosphatase	106
IV.2.4	Zytokine	107
IV.2.4.1	Interleukin-1 β (IL-1 β)	110
IV.2.4.2	Interleukin-6 (IL-6)	111
IV.2.4.3	Tumornekrosefaktor- α (TNF α)	112
IV.2.4.4	Interferon- γ (IFN γ)	113
IV.2.5	Mikroskopie	113
IV.3	Zusammenschau mit anderen Studien	114
IV.4	Standardisierbarkeit	116
IV.5	Resümee	117

V.	Zusammenfassung.....	119
VI.	Literaturverzeichnis	122
VII.	Anhang	153
VII.1	Abkürzungsverzeichnis.....	153
VII.2	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	157
VII.3	Curriculum vitae	160
VII.4	Publikationen	162
VII.5	Verzeichnis der Akademischen Lehrer.....	162
VII.6	Erklärung.....	163
VII.7	Danksagung.....	164

I. Einleitung

In Deutschland werden in der modernen Wiederherstellungschirurgie häufig Knochentransplantate verwendet. Auf Grund der bekannten Übertragung von Infektionskrankheiten über Knochentransplantate wurden verschiedene Verfahren zum Schutz des Patienten entwickelt.

Über Veränderungen der Biokompatibilität, die eine solche Behandlung der verwendeten Knochenstücke bedingt, sind in der aktuellen Literatur nur wenig Informationen zu finden. Unsere vorliegende Studie soll hier einen Beitrag leisten.

I.1 Die Geschichte der Knochentransplantation

Die wissenschaftliche Lehre der freien Knochentransplantation geht auf den Franzosen Ollier, mit dessen Werk „Traité experimental et clinique de la régénération des os“ um 1858, zurück [Ollier 1867]. Er machte die wichtige Funktion des Periosts in der Transplantatheilung deutlich und teilte erstmals grob die verschiedenen Transplantationsarten ein (siehe Tabelle 1).

Autogen / autolog	<u>Knochengewebe</u>			<u>Knochenersatz- materialien</u>
	Isogen / isolog	Allogen / homolog	Xenogen / heterolog	
Transplantat entstammt dem selben Individuum	Spender und Empfänger sind genetisch identisch (eineiige Zwillinge)	Transplantat wird von einem anderen Menschen entnommen	Transplantat entstammt einer anderen Spezies (z. B. bovin)	Künstlich hergestellte Materialien (z. B. Knochenzement, Hydroxylapatit- Keramiken oder Polymere)

Tab. 1: Zurzeit klinisch verfügbare Materialien für den Knochenersatz (obere Einteilung nach Ollier).

Das Problem der Heilung größerer Knochenverletzungen ist alt. So wurde die erste erwähnte Knochentransplantation schon 1668 durch van Meekeren an einem russischen Mann zur Deckung einer Schädelverletzung mit Hundeknochen vorgenommen [Sanan & Haines 1997]. 1821 gelang Walter dann die erste autologe Knochentransplantation, wonach 1881 erstmals MacEwen eine allogene Knochenverpflanzung beschrieb [Walter 1821; De Boer 1989; Gross et al 1993; MacEwen 1881]. Diese führte er bei einem jungen Mann durch, der an bakterieller Osteomyelitis des Humerusschaftes litt. Hier ersetzte er den gesamten Humerusschaft nach Entfernung und Ausheilung des kranken Teiles durch mehrere allogene Tibiadiaphysenstücke. Diese wuchsen im Verlauf der nächsten sieben Jahre vollständig ein. Bei den folgenden allogenen Knochentransplantaten handelte es sich in Ermangelung einer Knochenbank zumeist um frische Knochenstücke, die aus Amputaten oder von lebenden Spendern gewonnen wurden [Urist et al 1994; Sanan & Haines 1997].

Mit solchen unbehandelten Knochenersatzstücken aus langen Röhrenknochen arbeitete auch Lexer, einer der bekanntesten Transplantationschirurgen. Er führte mit ihrer Hilfe die Behandlung der Osteomyelitis und septischen Arthritis durch [Lexer 1908a, 1908b, 1911, 1924]. Die Operationen unter Verwendung von frisch amputierten Extremitätenknochen und Gelenkteilen verliefen nach Lexer zu 50 % erfolgreich, wobei der Erfolg an einer Wiederherstellung der normalen Funktion der entsprechenden Extremität gemessen wurde [Lexer 1925].

Nach Entdeckung und Einführung der Antibiotikabehandlung Anfang der 50er Jahre wurden Infektionen des Knochens jedoch meist antibiotisch und nicht mehr chirurgisch behandelt, so dass sich die Indikation zur Knochentransplantation fortan meist auf dem Gebiet der Tumorchirurgie ergab. In diesem Gebiet nahm vor allem Frank Parrish die Arbeit Lexers am M.D. Anderson-Hospital in Houston zur extremitätenerhaltenden Therapie von primären hochmalignen Knochentumoren wieder auf [Tomford 2000; Parrish 1973].

Das Einwachsen der Knochentransplantate wird als schleichender Abbau und Ersatz [Barth 1893] oder „creeping substitution“ [Phemister 1914] beschrieben und beruht wesentlich auf den folgenden drei Mechanismen:

- Osteogenese:** durch im Implantat überlebende Zellen selbst wird die Knochenneubildung und das Einwachsen des Transplantats beschleunigt [Burchart 1996]
- Osteoinduktion:** während der Revaskularisation des eingebrachten Knochentransplantats verursachen Proteine aus der erschlossenen Knochenmatrix (Bone morphogenetic proteins BMP) sowohl eine Proliferation von pluripotenten Mesenchymzellen als auch deren Differenzierung zu knorpel- bzw. knochenbildenden Zellen [Urist et al 1967; Kearney & Lomas 1997]
- Osteokonduktion:** das Knochentransplantat fungiert hierbei als Leitschiene für einwachsende Gefäße aus dem angrenzenden Transplantatlager, welche unspezifische Mesenchymzellen in das Transplantat einbringen, wo sie sich in Osteoblasten differenzieren und entlang der Trabekelbalkchen neues Osteoid produzieren [Kübler 1997].

Ein Problem in dieser Phase der Knochentransplantation stellte die Verfügbarkeit des Knochenmaterials dar, da noch keine suffiziente Lagerung und Konservierung möglich war. Schon frühzeitig wurden daher Versuche zur Konservierung durchgeführt, so auch von Carrel, der als Begründer der Kältekonservierung gilt. Er publizierte 1912 die Erfahrung französischer Kriegschirurgen, die Knochen bis zur Verwendung über Monate lagerten und während dieser Zeit durch Kühlung konservierten. Daher prophezeite Carrel eine unbegrenzte Lagerung von Organen und Geweben, so dass sie stets bei Bedarf zur Verfügung ständen [Carrel 1912].

Erst durch die Einführung der Kältekonservierung von Knochen durch Inclan und Bush in den 40er Jahren wurde die Schaffung von Knochenbanken ermöglicht [Inclan 1942; Bush 1947]. Bush führte hierbei sowohl die klinische Anwendung von Kühlgeräten zur monatelangen Kryokonservierung von Knochentransplantaten ein, als auch den Begriff „bone bank“ selbst. Nach der Erkenntnis des großen militärischen Nutzens bzw. Bedarfs einer Knochenbank wurde circa fünf Jahre später die Navy Tissue Bank in Bethesda, Maryland, gegründet, deren erster Direktor Dr. George Hyatt war [Hyatt 1950]. Nach diesem ersten Schritt zur Sicherstellung ausreichender Reserven an Knochentransplantaten suchte Hyatt einen Weg, die gewonnenen Transplantate günstig und vergleichsweise einfach lagern und transportieren zu können. Im Zuge dieser Überlegungen übernahm er das Prinzip der Lyophilisierung für die

Knochen transplantation und ermöglichte so den Transport der Knochen transplantate sogar nach Übersee, sowie deren jahrelange Lagerung ohne Kühlung.

Nachdem also die Grundlagen für moderne Knochenbanken gelegt worden waren, stellte sich zunehmend das Problem der Transplantatsicherheit bei der allogenen Knochen transplantation. Schon im Jahr 1953 berichtet James von der Übertragung von Tuberkulose durch Knochen transplantate aus Knochenbanken [James 1953] und ein Jahr später beschreibt Shutkin durch kältekonservierte Knochen transplantate hervorgerufene Hepatitisinfektionen [Shutkin 1954]. Um dieses Problem zu lösen, wurde zunächst ein intensiveres Spenderscreening veranlasst, so dass bekannte Risikogruppen mit erhöhter Inzidenz dieser Infektionskrankheiten von der Knochen spende ausgeschlossen wurden.

Nach der ersten bekannt gewordenen HIV-1-Übertragung durch ein allogenes Knochen transplantat im Jahre 1984 [Center of Disease Control 1988] wurde eine Weiterentwicklung der Knochen transplantatbehandlung und der Spenderauswahl unabdingbar, allerdings war zu dieser Zeit ein HIV-Bluttest noch nicht verfügbar. Trotz Durchführung neu entwickelter geeigneter Spenderuntersuchungen kam es zu weiteren HIV-Übertragungen [Simonds et al 1992; Schratt et al 1996b] und auch Fälle einer Übertragung von Hepatitis C durch allogene Knochen transplantate wurden bekannt [Eggen & Nordbo 1992; Conrad et al 1995; Strong 1994]. All diese Vorkommnisse führten dazu, dass sich der Forschungsschwerpunkt in der Knochen transplantation fortan auf das Gebiet der Elimination von Krankheitserregern aus den Transplantaten und der Verbesserung der Spenderauswahl ausrichtete.

Folgende Krankheitserreger stehen hierbei im Vordergrund [Garrel & Gotzen 1998]:

- Bakterien:** am häufigsten vegetative Bakterien, hier besonders Staphylokokken und Streptokokken;
- Viren:** Hepatitis-A- , -B- , -C- , und -δ-Virus, HIV I & II, HTLV-I, Zytomegalievirus, Epstein-Barr-Virus, Parvovirus, Rabiesvirus;
- Andere:** Treponema pallidum, Trypanosomen, Mikrofilarien, Malaria plasmodien;
- Prionen:** Creutzfeldt-Jacob-Agens.

I.2 Knochentransplantation heute

Auch in der modernen Chirurgie stellt die Behandlung von Knochendefekten, vor allem im Rahmen von Prothesenwechseloperationen und Rekonstruktionen nach Knochentumorresektionen, immer noch ein großes Problem dar und ist häufig auf die Verwendung von allogenen Knochentransplantaten angewiesen [Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer 2001]. So ist bei circa 15 % aller Operationen im Rahmen der Wiederherstellungschirurgie am Bewegungssystem und bei circa 50 % der rekonstruktiven Ohrchirurgie Knochenersatz von Nöten [Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer 1996]. Insgesamt geht man in Deutschland von einem Volumen von etwa 75.000 autologen und circa 30.000 allogenen Knochentransplantationen aus, während in den USA jährlich circa 650.000 bis 800.000 Knochentransplantate Verwendung finden [Richtlinie 2004/23/EG des Europäischen Parlaments von 2004; Jerosch et al 1990; Garrel 2003; CDC 2002].

Die Einheilung und spätere Belastbarkeit des Transplantats ist hierbei sowohl von der Beschaffenheit des Transplantatlagers, als auch von der des verwendeten Transplantat- bzw. Ersatzmaterials abhängig. So kann man auf Seiten des Lagers nach Lexer zwischen einem ersatzstarken (gut vaskularisiert und vital), einem ersatzschwachen und einem ersatzunfähigen (sehr schlecht durchblutet und überwiegend avital) Lager unterscheiden [Lexer 1924].

Das verwendete Knochentransplantat oder Ersatzmaterial sollte im Idealfall folgende Bedingungen erfüllen [Garrel & Gotzen 1998]: Es darf beim Empfänger keine Abstoßungsreaktion auslösen oder gar toxische Nebenwirkungen bedingen. Weiterhin sollte es nach einiger Zeit komplett in die Knochenstruktur des Wirts integriert sein und diesen Umbau möglichst aktiv durch erleichterte Revaskularisation, Freisetzung von Wachstumsfaktoren und osteokonduktive Eigenschaften fördern. Darüber hinaus muss ein solcher Knochenersatz die mechanischen Voraussetzungen für eine stabile Osteosynthese gewährleisten. Um eine leichte Handhabung des Materials zu garantieren sollte das Produkt in beliebiger Größe und Form verfügbar sein, sich leicht bearbeiten und unter einfachsten Bedingungen steril lagern lassen. Zudem sollte das Produkt kostengünstig sein. Bis zum heutigen Zeitpunkt gibt es allerdings noch kein Material im klinischen Gebrauch, das all diesen Anforderungen entspricht.

I.3 Knochenersatzmaterialien

I.3.1 Autologe Knochentransplantation

Nach wie vor ist die Verwendung autogener Knochentransplantate Goldstandard, da sie die einzige Methode darstellt, bei der auch die osteogenen Eigenschaften des Transplantats erhalten bleiben. Auf Grund fehlender immunogener Abwehrreaktionen und eines sehr geringen Infektionsrisikos zeigt sich dabei eine schnelle Einheilung und Revaskularisation des Transplantats. Zudem verfügt ein autologes Transplantat über den Vorteil, dass osteoinduktive Proteine und Wachstumsfaktoren in physiologischer Menge und Bindung vorhanden sind [Bolander & Balian 1986].

Allerdings haben autologe Knochentransplantate auch einige Nachteile. Die Suche nach vergleichbaren Materialien endet nicht. Durch die Entnahme des Knochenstückes, meist aus der Darmbeinschaukel desselben Patienten, ergibt sich die Notwendigkeit eines Zweiteingriffs, der besonders bei Kindern, Schwerverletzten und Patienten in schlechtem Allgemeinzustand eine Ausweitung des Gewebetraumas und damit teils nicht vertretbare Risiken mit sich bringt. Ein solcher Zweiteingriff geht in der Regel mit einer erhöhten Komplikationsrate einher, z. B. Hämatome, Nervenläsionen [Chou et al 2004], Infektionen, Herniationen [Bosworth 1955; Challis et al 1975; Hamad & Majeed 1989], Pseudoaneurysmen der A. glutea superior verbunden mit einer Urethraverletzung [Catinella et al 1990] oder Gefäßverletzungen der A. glutea superior [Lim et al 1996] und Beckenfrakturen [Guha & Poole 1983; Ubbhi & Morris 1984]. Außerdem kommt es zu einer verstärkten postoperativen bzw. persistierenden Schmerzsymptomatik [Greenwald et al 2001].

Ein weiterer entscheidender Nachteil autologer Knochentransplantationen ist die Verfügbarkeit bei großen Gewebedefekten und entsprechendem Bedarf an Ersatzmaterial.

I.3.2 Allogene Knochentransplantation

Zur Lösung des Problems der Verfügbarkeit und der Komplikationen autologer Knochentransplantate bieten sich allogene Knochenspenden an. Sie sind, sofern sich genügend Spender finden, nahezu unbegrenzt verfügbar. Die Gewinnung allogener Knochentransplantate erfolgt meist im Rahmen einer Femurkopfosteotomie bei endoprothetischer Versorgung eines Hüftgelenkes mit anschließender Kryokonservierung und/ oder Desinfektion oder Sterilisation. Diese Transplantate werden vor allem auf Grund ihrer osteoinduktiven und osteokonduktiven Potenz in die bestehende Knochenmatrix eingebaut. Die positiven osteoinduktiven Eigenschaften der allogenen Transplantate sind jedoch abhängig vom Lebensalter des Spenders, der Transplantatprozessierung und der Lagerungsdauer und nehmen ab dem 40. Lebensjahr des Spenders signifikant ab [Kearney & Lomas 1997; Jergesen et al 1991; Nicolas et al 1994].

Das Risiko einer immunologischen Reaktion bzw. einer möglichen Übertragung von Infektionskrankheiten, wie z. B. HIV oder Hepatitis-B-Viren [Aaboe et al 1995; Kakaiya et al 1991] ist bei dieser Transplantationsform gegeben und setzt ein intensives Spenderscreening und eine Aufbereitung der Proben vor ihrer Verwendung voraus.

I.3.3 Xenogene Knochentransplantation

Xenogene Transplantate stellen eine kostengünstige und beinahe unbegrenzt verfügbare Methode für den Knochenersatz dar. Allerdings stellen sich auch hier die Probleme der Infektionsübertragung und immunologischer Abstoßungsvorgänge, auf Grund des Unterschieds der Spezies von Empfänger und Spender.

Eine osteokonduktive Wirkung kann auch bei diesem Knochenersatzmaterial gefunden werden und Wetzel konnte im Tierversuch eine direkte Anlagerung neu gebildeten Knochens an xenogene Implantate nachweisen [Wetzel et al 1995].

I.3.4 Künstliche Knochenersatzmaterialien

Die alloplastischen Knochentransplantate in Form künstlich hergestellter Materialien sind die vierte große Gruppe der möglichen Knochentransplantate. Durch ihre industrielle Produktion stellen sie eine mengenmäßig unbegrenzt verfügbare, aber entsprechend kostenintensive Alternative dar.

Durch Kombination alloplastischer Trägermaterialien mit Bone morphogenetic proteins (BMP) kann die sonst rein osteokonduktive Wirkung noch durch osteoinduktive Eigenschaften verbessert werden [Aaboe et al 1995; Terheyden et al 1997; Terheyden & Jepsen 1999; Warnke et al 2006].

I.4 Sterilisation / Desinfektion der allogenen Transplantate

Zur Vermeidung der Übertragung infektiöser Krankheiten ist wie bereits ausgeführt eine weitere Aufbereitung der verschiedenen Knochentransplantate zwingend erforderlich, da Infektionen durch ausschließliches Spenderscreening nicht ausgeschlossen werden können. Hierbei wird unter Sterilisation ein Prozess verstanden, der eine Reduktion auf höchstens 10^{-6} keimbildende Einheiten zur Folge hat. Bei der Desinfektion wird im Vergleich dazu nur eine Keimreduktion auf 10^{-5} keimbildende Einheiten erreicht.

Zusätzlich bewirken einerseits Fremdanigene des „major histocompatibility complex“ (MHC) eine Immunantwort mit Abstoßungsreaktion beim Empfänger [Friedlaender 1983]; andererseits können Kollagen und Proteoglykane als Bestandteile der Matrix von Knochentransplantaten eine geringe Immunreaktion hervorrufen [Bätge et al 1997; Czitrom et al 1985; Horowitz & Friedlaender 1991]. Auch unter dem Aspekt, diese Antigenität zu mindern, ist eine Behandlung des Transplantats sinnvoll [Kuner et al 1998].

Nach jahrzehntelanger Erforschung verschiedener Sterilisations- und Desinfektionsverfahren im Bereich der Knochentransplantation wurden verschiedene Verfahren vorgestellt [Knaepler et al 1994a]. Unter anderem sind die physikalische Sterilisation durch Gammabestrahlung, chemische Verfahren mit PES/ Ethanol, Wärmeverfahren und Kombinationsbehandlungen, wie zum Beispiel das Tutoplast®-Verfahren (Lösungsmittelkonservierung und Sterilisation mit Gammastrahlung), im

klinischen Gebrauch [Bright et al 1987; Versen et al 1992; Wutzler & Sauerbrei 2000; Hofmann et al 1996]. Alle diese Methoden führen zu einer maximalen Keim- und Virusinaktivierung, beeinflussen jedoch die biomechanischen Eigenschaften der Transplantate unterschiedlich [Godette et al 1996; Knaepler et al 1991; Shin et al 2005; Vastel et al 2004].

Über eine ebenfalls vorhandene Alteration der osteogenen, osteoinduktiven und osteokonduktiven Merkmale der Transplantate durch die unterschiedlichen Verfahren wird in der aktuellen Literatur wenig berichtet.

Im Folgenden wird das in dieser Arbeit verwendete Desinfektionsverfahren kurz vorgestellt.

Thermische Desinfektion

Um bei allogenen Knochentransplantaten eine möglichst hohe Sicherheit vor Infektionen bei bleibenden osteoinduktiven, -konduktiven und biomechanischen Eigenschaften zu erreichen, wurde die 80°C- Wärmebehandlung entwickelt.

Eine eingehende Untersuchung der 80°C- Thermodesinfektion von humanen Femurkopftransplantaten erfolgte durch v. Garrel und Knaepler [Knaepler et al 1990, 1992a, 1992b, 1994a, 1994b; Garrel et al 1993, 1994, 1997; Garrel & Gotzen 1998; Hofmann et al 1996]. Anhand zahlreicher klinischrelevanter Bakterienstämme wurde sowohl die antibakterielle Desinfektionswirkung dieses Verfahrens, als auch die antivirale Wirkung bei Versuchen mit umhüllten Viren (HIV-2, BVDV „bovine viral diarrhoea virus“ als Modell für Hepatitis-C-Virus und Pseudorabiesvirus als Vertreter der Herpesviren) und hüllenlosen Viren (Hepatitis-A-Virus, Poliomyelitis Virus und bovines Parvovirus) nachgewiesen [Pruss et al 2003a, 2003b].

I.5 Zellkultur und Tierversuche

Bereits in den 1930er Jahren wurden erste Versuche der Biokompatibilitätsprüfung im Tierversuch vorgenommen, um schädigende Einflüsse von Biomaterialien auf den menschlichen Organismus schon vor klinischer Anwendung ausschließen zu können [Dixon und Rickert 1933]. Auch wenn Tiermodellversuche bis in die heutige Zeit ein wichtiges Mittel in der Erforschung von Biomaterialien darstellen und noch immer Verwendung finden, so stellt sich doch immer die Schwierigkeit der Standardisierbarkeit und Reproduzierbarkeit [Hayashi et al 1989; Wilke et al 1991, 1992; Warnke et al 2006]. Auch die Übertragbarkeit des Tiermodells auf den menschlichen Organismus ist nicht immer unproblematisch, weshalb immer wieder Versuche unternommen wurden, Modelle zu entwickeln, die die Situation in vivo am Menschen am besten wiedergeben.

In dieser Studie sollen die Reaktionen des menschlichen Körpers auf eingebrachte Knochentransplantate möglichst nah der Situation in vivo bei guter Reproduzierbarkeit untersucht werden. Einen Ansatz hierfür stellt die Zellkultur dar, die mit den unterschiedlichsten Zellarten durchgeführt werden kann. Da Knochentransplantate in traumatisch oder chirurgisch alterierten Knochen eingebracht werden, kommen sie nicht nur mit einem Zelltyp, sondern mit einer Vielzahl verschiedener Zellarten in unterschiedlichsten Differenzierungsstufen in Kontakt. Zum anderen spielen bei immunologischen Geschehen nach Transplantation, wie sie in dieser Studie untersucht werden sollen, Wechselwirkungen zwischen unterschiedlichen Zelltypen eine Rolle. Um dieses komplexe Milieu, in das die Knochenstücke implantiert werden, in vitro zu simulieren, wählten wir die humane Knochenmarkszellkultur aus.

Die Basis für das in dieser Studie verwendete Zellkultur-Modell stellt das 1976 von Bexter und Mitarbeitern entwickelte Konzept zur Langzeitkultivierung von Mäuseknochenmark dar. Es folgte eine Weiterentwicklung hinsichtlich der Kultur von humanem Knochenmark 1980 und weitere Modifikationen 1991 durch Kalla und Mitarbeiter [Hocking & Golde 1980; Gartner & Kaplan 1980; Kalla et al 1991]. Diese Arbeitsgruppe nutzte erstmals auch die mittlerweile entdeckten hämopoetischen Wachstumsfaktoren Interleukin-3 (IL-3) und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden-Faktor (GM-CSF) als Zusatz zur Knochenmarkszellkultur [Kalla et al 1991]. Neben diesem Zellkulturmodell, das primär der Erforschung der Hämatopoese diente, stellten Wilke und Mitarbeiter 1991 ein gleichartiges „in vitro“ Zellkulturmodell

vor, das unter Verwendung humanen Knochenmarks – steril im Rahmen einer Hüft-Total-Endoprothese gewonnen – bei der Erforschung der Biokompatibilität verschiedener Biomaterialien helfen sollte [Wilke et al 1991].

Dieses weiterentwickelte Zellkulturmodell wird im Rahmen der vorliegenden Studie zur Analyse des Zytokinprofils und der Enzymbestimmung der humanen Knochenmarkszellkultur unter Exposition von unbehandelten autologen bzw. 80°C-wärmebehandelten Knochenprobenkörpern angewendet.

Hierbei ist besonders die weiße Zellreihe (Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten) von Interesse, da das Immunverhalten der Knochenmarkszellen auf Fremdkörperreize (z. B. allogene Knochentransplantate) untersucht wird.

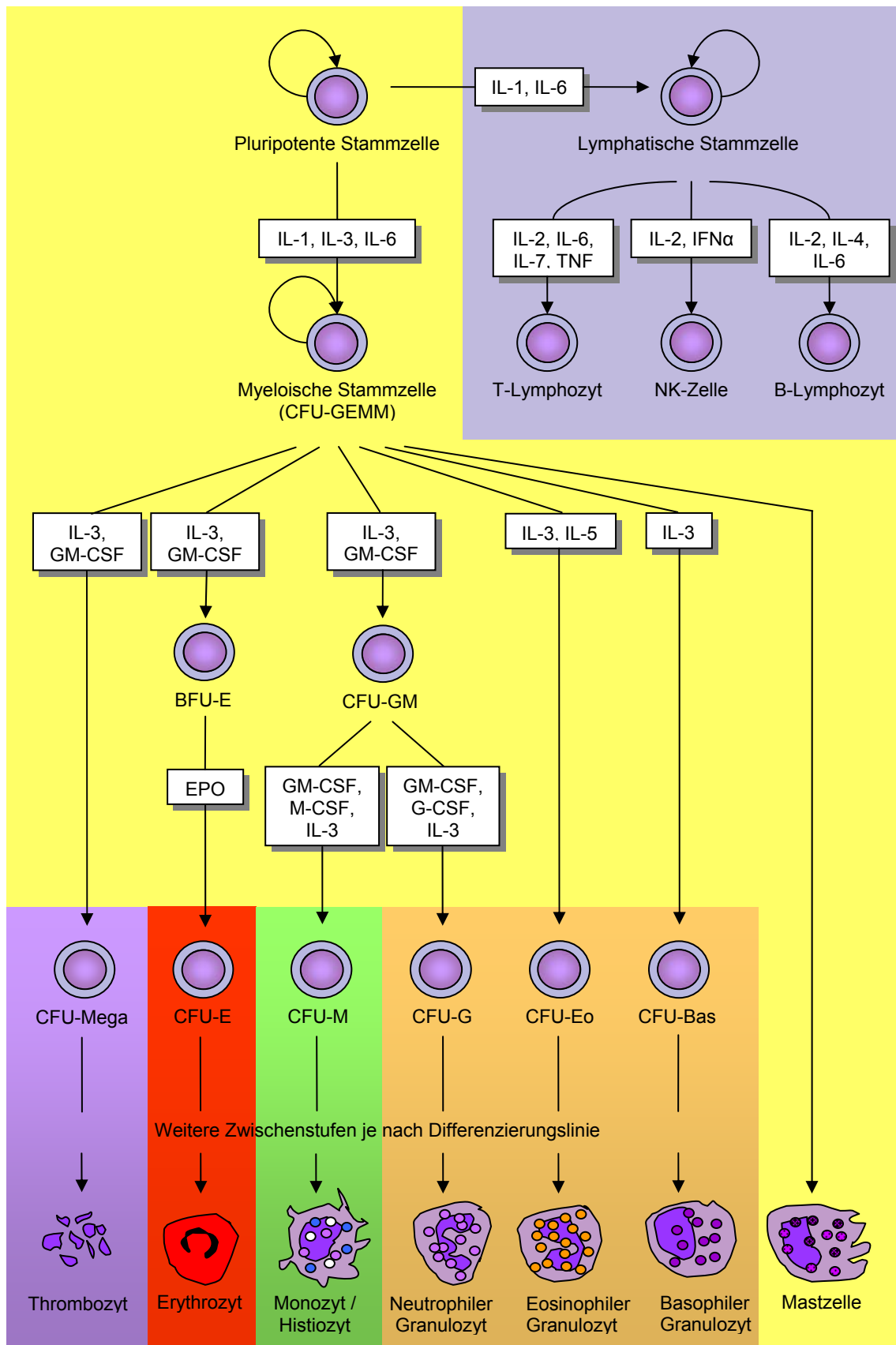


Abb. 1: Darstellung der Hämatopoese unter Einfluss verschiedener Zytokine (modifiziert nach Böcker et al 2001).

I.6 Knochenstoffwechsel

Knochen stellt ein hoch komplexes Gewebe dar, das während des gesamten Lebens von steten Umbauvorgängen begriffen ist. Dieser Knochenanbau ist Voraussetzung für Wachstum, Formation und Defektbeseitigung im Knochen [Buckwalter et al 1995]. Hierbei sind Knochenabbau und -aufbau miteinander gekoppelt und werden als „Bone remodeling“ bezeichnet. Da dieser normale Prozess jedoch nur 5 % des Gesamtknochenvolumens pro Jahr erneuert, sind beschleunigende Mechanismen nötig, um eine ausreichende Reparatur bei Frakturen und anderen Defekten situationsbedingt zu gewährleisten [Kleinheinz 2000].

Am Knochenumbau sind zum einen Osteoklasten beteiligt. Diese auf die Resorption von Knochensubstanz spezialisierten Zellen gehen auf die gleichen Stammzellen im Knochenmark zurück, wie auch die Monozyten (CFU-GM) [Parfitt 1998] und haben eine durchschnittliche Lebensdauer von zehn Tagen [Cowin 2001]. Über Migration aus dem Knochenmark und über den Blutweg gelangen Vorläuferzellen der Osteoklasten zum Knochen [Manolagas 1995]. Die Osteoklasten lagern sich hierbei über Oberflächenrezeptoren der Knochenmatrix an und führen dort durch Ansäuerung zur Demineralisation des Knochens. Anschließend bauen Kollagenasen und andere proteolytische Enzyme die organische Matrix ab [Väänänen 1996]. Es entstehen Resorptionslagunen, benannt nach John H. Howship (1781 – 1841).

Zum anderen sind Osteoblasten beteiligt, deren Hauptaufgabe die Produktion der Knochenmatrix ist, die zu circa 90 % aus Kollagen-I und etwa zu 10 % aus nicht kollagenen Proteinen besteht. Osteoblasten entstehen durch Differenzierung von Fibroblasten und Mesenchymzellen und gehen auf die CFU („colony forming units“) der Fibroblasten (CFU-F) zurück [Teitelbaum 2000; Prockop 1997, Owen 1985; Owen & Friedenstein 1988]. Sie wandern z. B. in die durch Osteoklasten geschaffenen Lagunen ein und sondern dort eine Kollagenmatrix ab. Diese wird unter Einfluss von Knochenproteinen wie z. B. Osteocalcin zu Osteoid [Parfitt 1994], welches später mineralisiert wird.

An der Regulation des Zusammenspiels von Osteoblasten und Osteoklasten sind verschiedene Zytokine beteiligt. So beginnt jede Frakturheilung zunächst mit einer entzündlichen Reaktion, in deren Verlauf unter anderem Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-1 β (IL-1 β) und Tumornekrosefaktor- α (TNF α) freigesetzt werden [Kon et al

2001]. Diese Zytokine wurden in der vorliegenden Studie bestimmt, um Rückschlüsse auf die Vorgänge nach Transplantation der verschieden desinfizierten Knochenkörper zu gewinnen.

Zytokine beeinflussen meist mehrere Zellarten mit unterschiedlichem Effekt (Pleiotropismus) und sind bereits in picomolaren Konzentrationen wirksam. Die Produktion und Sekretion der Zytokine findet nur kurzzeitig während der Aktivierung der Produktionszelle statt und beruht fast immer auf deren Neubildung, nicht auf der Ausschüttung präformierter Peptide [Peter & Pichler 1996].

Von (IL-6), (IL-1 β) und (TNF α) wurde bereits früh ein aktivierender Einfluss auf Osteoklasten beschrieben [Bertolini et al 1986; Canalis 1986, 1987; Flad & Gernsma 1997; Ishimi et al 1990; Jilka et al 1992; Suda et al 1995].

Neuere Studien zeigen das Zusammenspiel zwischen proinflammatorischen Interleukinen wie IL-1 und TNF α und dem Knochenstoffwechsel in Zusammenhang mit dem Rezeptor-Aktivator des Zellkernfaktors κ B (RANK) und seines Liganden (RANKL). RANK wird auf der Zellwand von T-Zellen, Osteoblasten und Stromazellen exprimiert [Wong et al 1997; Lacey et al 1998; Yasuda et al 1998]. Hierbei wird der Rezeptor durch diese Interleukine von Osteoblasten verstärkt gebildet und führt dadurch zu einer vermehrten Differenzierung von Osteoklasten [Yasuda et al 1998; Hofbauer et al 1999; O'Brien et al 1999]. Zudem wurde gezeigt, dass IL-1 und TNF α die Differenzierung zu Osteoklasten auch direkt stimulieren können [Kobayashi et al 2000; Azuma et al 2000; Kim et al 2005].

TNF α führt zu verstärkter Osteoklastogenese über eine Produktionserhöhung von RANKL und M-CSF in Stromazellen und auch eine Verstärkung der Ansprechbarkeit von Osteoklasten-Vorläuferzellen auf RANKL [Hofbauer et al 1999; Lam et al 2000]. Diese osteoklastogenen Effekte von TNF α werden auch von IL-6 vermittelt [Devlin et al 1998]. Zudem hemmt TNF α neben dieser Förderung der Osteoklasten die Entstehung von Osteoblasten [Nanes 2003].

Auch IL-1 führt zu vermehrter RANKL-Bildung in Stromazellen und wirkt auf Osteoklasten lebensverlängernd und aktivitätssteigernd. Hierbei vermittelt es unter anderem auch die TNF α -Wirkung durch direkte Stimulation der Differenzierung von Osteoklasten-Vorläuferzellen [Wei et al 2005]. Aber auch über die Induktion der Prostaglandinsynthese wirkt IL-1 stimulierend auf die Knochenresorption bei zusätzlicher Inhibition der Knochenneubildung [Canalis 1986, 1987].

Durch die Aktivierung von NF κ B durch TNF α und IL-1 führen beide Zytokine zu einem verstärkten Knochenabbau bei gleichzeitiger Hemmung der Osteoblastenfunktion.

Interferon- γ (IFN γ) wird unter anderem von aktivierten T-Zellen produziert; es hat in vitro einen hemmenden Effekt auf Osteoklasten und führte bei Versuchen mit Nacktmäusen zu erniedrigten Serum-Kalziumwerten und verminderter Knochenresorption [Takayanagi et al 2000; Sato et al 1992]. Sasaki et al wiederum berichteten, dass IFN γ keinen wichtigen Anteil an der infektinduzierte Knochenresorption hat [Sasaki et al 2004].

Auch IL-6 spielt als Akut-Phase-Protein und Mediator im Knochenstoffwechsel eine wichtige Rolle. Die Bildung von IL-6 wird zum einen durch Infektionen und Zytokine (vorrangig IL-1 und TNF) in Monozyten, Endothelzellen, Fibroblasten oder aktivierten T-Zellen induziert, zum anderen wird IL-6 aber auch in kleinen Mengen von ausgereiften Osteoblasten produziert [Peter & Pichler 1996; Dodds et al 1994]. Den Einfluss auf die Knochenresorption zeigten unter anderem Studien an IL-6-Knockout-Mäusen, die vor Gelenkentzündungen und Knochendestruktionen bei Arthritis geschützt waren [Naka et al 2002; Wong et al 2003; Sasai et al 1999]. Eine vermehrte Osteoklastenreifung in vitro und in vivo über stimulierende Effekte auf die IL-1 β -Produktion in Fibroblasten und Knochenmarkszellen beschrieben Arbeitsgruppen von Kurihara und Kotake [Kurihara et al 1990; Kotake et al 1996]. Diese Stimulation der Osteoklastenreifung geht wie Studien von Kudo et al belegen auch ohne die Vermittlung von RANKL von statten [Kudo et al 2003]. Bei primitiven hämatopoetischen Stammzellen führt IL-6 zu einer beschleunigten Teilung und erhöhten Sensibilität gegenüber anderen Wachstumsfaktoren, weshalb es auch zu den synergistischen Faktoren der Hämatopoese gezählt werden kann [Matsuda & Kishimoto 1998; Jansen et al 1992; Okano et al 1989; Suzuki et al 1989].

Neben diesen spezifischen Funktionsträgern im Knochenstoffwechsel wurden auch allgemeine Knochenzell- und Vitalitätsparameter bestimmt. Hier wurden Enzyme oder Substanzen gemessen, die für den Zellstoffwechsel essentiell sind oder durch bestimmte Stoffwechselvorgänge gebildet werden. Diese liegen intrazellulär in weit höherer Konzentration vor als extrazellulär, so dass eine Erhöhung dieser Parameter im Serum z. B. durch eine Schädigung der Zellmembran hervorgerufen werden kann. Auch eine

vermehrte Bildung der Enzyme/ Substanzen in den Zellen z. B. während Wachstumsvorgängen kann zu einer Erhöhung der Werte führen.

Lactat wurde als Indikator für Stress bzw. eine gesteigerte Arbeitsleistung der kultivierten Zellen bestimmt. So führen z. B. eine Überladung der Zelle mit Pyruvat, Sauerstoffmangel, ATP-Verarmung oder ein Abfall des pH-Wertes zu einem Anstieg von Lactat.

Die alkalische Phosphatase (AP) wird von Osteoblasten im Differenzierungsstadium während des Knochenaufbaus (z. B. im Rahmen einer Frakturheilung) vermehrt gebildet [Aubin et al 1995; Nyman et al 1991]. Eine physiologische Erhöhung der Alkalischen Phosphatase findet sich z. B. bei Gravidität, in der Wachstumsphase, während der Frakturheilung und nach Mahlzeiten (Dünndarm-AP).

Die Lactatdehydrogenase wurde als sehr sensibler, aber wenig gewebspezifischer Marker für Membrandefekte, Zelluntergang und Gewebeschäden gewählt, da sie im Gewebe in circa 500fach höherer Konzentration als im Serum vorliegt.

I.7 Fragestellung

Ziel dieser Studie ist es, anhand einer humanen Knochenmarkszellkultur die Unterschiede verschiedener Sterilisations- bzw. Desinfektionsverfahren von Knochentransplantaten und ausgesuchten Knochenersatzmaterialien im Hinblick auf ihre immunmodulativen Eigenschaften im Vergleich zur autologen Knochentransplantation zu untersuchen. Zuletzt fanden auf diesem Gebiet vorwiegend Studien zur Auswirkung der Behandlung auf die mechanische Belastbarkeit statt. Da bislang jedoch nur wenige Ergebnisse bezüglich der Biokompatibilität der verschiedenen Verfahren vorliegen, wurde die vorliegende Studie geplant.

So wurde untersucht, ob sich Unterschiede in der Expression der Zytokine Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6), Interferon- γ (IFN γ) und Tumornekrosefaktor- α (TNF α) in einer Knochenmarkszellkultur unter Exposition entsprechend behandelter Spongiosakörper finden lassen.

Lassen sich Aussagen zur Vitalität der Zellkultur und eventueller Osteoblastentätigkeit in diesem Zeitraum durch die Bestimmung von Lactat, Lactatdehydrogenase (LDH) und alkalische Phosphatase (AP) treffen?

Abschließend soll diese Studie im Kontext mit anderen Studien betrachtet werden und es soll eine mögliche Interpretation der verschiedenen Ergebnisse erfolgen.

II. Material und Methoden

II.1 Versuchsmaterialien

II.1.1 Geräte

II.1.1.1 Laborgeräte

Critical Point Kammer	Balzers, Liechtenstein
Sputter coater S150	Edwards, West Sussex, GB
Rasterelektronenmikroskop ISI SX 30	ISI, GB
Mikrotom Polycut E	Reichert-Jung
Bandelin Sonorex TK 52	Bandelin Electronic, Berlin
Pipetman [®] P 20, P 200, P 1000	Gilson Inc., Middleton, USA
Pipetus [®] -akku	Hirschmann [®] Laborgeräte, Eberstadt
Eppendorf Multipipette [®] plus	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetman [®] Ultra Multichannel 8x300	Gilson Inc., Middleton, USA
Labofuge 400R	Heraeus Instruments, Hanau
Biofuge 13	Heraeus Instruments, Hanau
Schüttler Swip KS-10	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Vortex: REAX 2000	Heidolph, Kelheim
Heizplatte mit Magnetrührer MR2002	Heidolph, Gießen
Autoklav 3850 EL	Tuttnauer, NY, USA
Hitzeschrank, SUT 6200	Heraeus, Hanau
Feinwaage I 1801	Sartorius GmbH, Göttingen

II.1.1.2 Geräte für Probenschnitt / -bearbeitung und Zubehör

EXAKT-Trennschleifsystem	EXAKT Apparatebau GmbH, Norderstedt
Diamant-Trennband D64 0,2mm	DIA-Plus Walter Messner GmbH, Oststeinbek
Bohrer PF360	Proxxon GmbH, Niersbach
Schublehre	Mitutoyo, Mexiko
Rotator Reax2	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach
4" Splash Shield	MicroAire, Charlottesville USA
Lavage Tubing Set Total Knee	MicroAire, Charlottesville USA

II.1.1.3 Desinfektion

Lobator SD-2	Telos GmbH, Marburg
Desinfektionsgefäß	Telos GmbH, Marburg

II.1.1.4 Zellkultur

Brutschrank BB-16 CU	Heraeus Instruments, Hanau
Durchlichtmikroskop DM IL Fluo	Leica, Wetzlar
Vertikal Laminar Flow Gerät UV 1800	Uniflow
Bunsenbrenner	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Neubauer-Kammer	Schreck, Hofheim

II.1.1.5 Analytische Geräte

Analysegerät Hitachi 917	Roche, Mannheim
Casy [®] 1 TTC, Version SC1 TTC (Zellzähler)	Schärfe System GmbH, Reutlingen
Digital-pH-Meter 646	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin
Titertek [®] Multiskan MC	Flow Laboratories GmbH, Meckenheim

II.1.1.6 Kühlgeräte

-80°C Hera freeze, HFU 586 basic	Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau
-20°C	Liebherr, Ochsenhausen
+4°C	Liebherr, Ochsenhausen

II.1.2 Chemikalien, Enzyme und VerbrauchsmaterialienII.1.2.1 Zellkultur

Iscove's modified Dulbeccos medium (IMDM) Pulver	Gibco, Karlsruhe
Pferdeserum hitzeinaktiviert	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AU
Fetales Kälberserum hitzeinaktiviert	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AU
Certomycin [®]	Essex Pharma, München
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin
Hydrocortison	Sigma Diagnostics, St. Louis, USA
Interleukin-3 (IL-3) Human Recombinant	Calbiochem [®] Merck, Darmstadt
Granulocyte-macrophage-colony- stimulating-factor (GMCSF) human	Calbiochem [®] Merck, Darmstadt
Accutase	PAA Laboratories GmbH, Pasching (AU)
Trypsin-EDTA Solution	Sigma Diagnostics, St. Louis, USA
Cellstar Gewebekulturschalen 35 / 10 mm	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen

II.1.2.2 Interleukin- und Enzymbestimmung

Lactate Reagenz	Roche, Mannheim
Alkalische Phosphatase IFCC liquid Reagenz	Roche, Mannheim
LDH IFCC-liquid Reagenz	Roche, Mannheim

BD OptEIA™ Human Il-6 ELISA Set	BD Bioscience Pharmingen, San Diego, USA
BD OptEIA™ Human Il-1β ELISA Set	BD Bioscience Pharmingen, San Diego, USA
BD OptEIA™ Human IFN-γ ELISA Set	BD Bioscience Pharmingen, San Diego, USA
BD OptEIA™ Human TNF ELISA Set	BD Bioscience Pharmingen, San Diego, USA
Je Set :	<ul style="list-style-type: none"> -Capture Antibody, Anti Human Il-6 (Il-1β, IFN-γ, TNF-α), liquid, 1,0 ml, BD Bioscience Pharmingen, San Diego, USA -Detection Antibody, Biotinylated Anti Human Il-6 (Il-1β, IFN-γ, TNF-α), liquid, 1,0 ml, BD Bioscience Pharmingen, San Diego, USA -Enzym Reagent, Avidin-horseradish peroxidase conjugate, liquid, 1,0 ml, BD Bioscience Pharmingen, San Diego, USA -Standards Recombinant Human Il-6 120 ng/ vial (Il-1β 100 ng/ vial, IFN-γ 75 ng/ vial, TNF-α 110 ng/ vial), Lyophilized, BD Bioscience Pharmingen, San Diego, USA
BD OptEIA™ Assay Diluent	BD Bioscience Pharmingen, San Diego, USA
BD OptEIA™ Substrate Reagent A	BD Bioscience Pharmingen, San Diego, USA
BD OptEIA™ Substrate Reagent B	BD Bioscience Pharmingen, San Diego, USA
BD OptEIA™ Stop Solution	BD Bioscience Pharmingen, San Diego, USA
BD OptEIA™ Coating Buffer Sodium	BD Bioscience Pharmingen, San Diego, USA
BD OptEIA™ Wash Concentrate (20x)	BD Bioscience Pharmingen, San Diego, USA
Nunc-Immuno Platten MaxiSorp F96	Nunc & Co KG, Wiesbaden

II.1.2.3 Färbungen

Osmiumtetroxid	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Giemsa Lösung	Merck, Darmstadt
Entellan	Merck, Darmstadt

II.1.2.4 Desinfektion, Knochenaufbereitung, Knochenmarkspräparation

PBS-Dulbecco w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom AG, Berlin
Biocoll Separating Solution, 1,077	Biochrom AG, Berlin
Histopaque [®] , 1,119	Sigma Diagnostics, St.Louis, USA
Earle's Salt Solution	Biochrom AG, Berlin
Penicillin mit Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AU
Gentamicin	Sigma Diagnostics, St. Louis, USA
Amphotericin B	Sigma Diagnostics, St. Louis, USA
0,2% Liquemin	Hoffmann-La Roche

II.1.2.5 Chemikalien und Puffer

NaHCO ₃	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
Aceton	Merck, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd-Pulver	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
Kupfer-(III)-Sulfat-Pentahydrat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Formaldehydlösung 37 %	Merck, Darmstadt
Methanol	Riedel-de Haën AG, Seelze
Natrium Cacodylat	SERVA, Heidelberg
Poly-L-Lysine Solution 0,1 % w/v in water	Sigmy-Aldrich Co, St. Louis, USA
Glutaraldehydlösung 25 %	Merck, Darmstadt

II.1.2.6 *Technoviteinbettung*

Xylol	Merck, Darmstadt
Technovit 9100 Neu	Heraeus Kulzer, Hanau
Tissue-Tek Uni-Cassets	Miles, Naperville, Irland
Polyethylenfolie	Heraeus Kulzer, Hanau

II.1.2.7 *Verbrauchsmaterialien*

Eppendorf Reaktionsgefäß 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Safe-Lock Tubes 2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg
15 ml, 50 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon [®])	Becton-Dickenson Labware, Franklin Lakes, USA
10 ml Pipetten (Cellstar [®])	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen 200 µl, 1000 µl	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Pasteur Pipetten	Hirschmann [®] Laborgeräte, Eberstadt
Eppendorf Biopur [®] Combitips plus 5 ml, 25 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Unolok sterile Spritzen 50 ml	HMD Healthcare Limited, West Sussex, GB
Millex [®] -GS, 0,22 µm Spritzenaufsatzfilter	Millipore Corpoartion, Bedford USA
Falcon [®] Bottle Top Filter 150 ml (0,45 µm, 0,22 µm)	Becton-Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA
Objektträger Super Frost [®] Plus (25 x 75 x 1,0 mm)	Menzel-Gläser, Braunschweig
Deckgläser rund Ø 2 cm	Menzel-Gläser, Braunschweig
Casy-ton	Schärfe, Reutlingen
Casy cups	Schärfe, Reutlingen

II.1.3 Angesetzte Lösungen und Medien

II.1.3.1 Zellkultur – Medium

Als Nährmedium für die Zellkultur wurde IMDM = Iscove's modified Dulbecco's Medium verwendet [Kalla et al 1991].

Zusammensetzung für 500 ml IMDM :

5 ml L-Glutamin (292,3 ng/ ml)

0,25 ml Certomycin[®] 200

0,5 ml Hydrocortison einer 5 mmolaren Stammlösung (2,4 ng/ ml)

30 ml NaHCO₃ 5 %

8,85 g ISCOVE's (Gibco[™])

65 ml fetales Kälberserum (FKS) hitzeinaktiviert

65 ml Pferdeserum (HS) hitzeinaktiviert

370 ml Aqua dest.

Es wurde eine durchschnittliche Osmolarität von 0,344 osm/ ml gemessen, diese wurde durch Gefrierpunktniedrigung ermittelt.

II.1.3.2 Liqueminhaltiger Phosphatpuffer

0,2 % Liquemin + PBS pH 7,4

II.1.3.3 Ponal – Lösung

1000 ml Ponal-Lösung (2 % in Aqua dest.) + 500 ml Poly-L-Lysin (0,01 %)

II.1.3.4 Earles Salt Solution

50 ml Earles Salt Solution 10x (Fa. Biochrom KG) mit Aqua bidest. auf 500 ml aufgefüllt.

II.1.3.5 Wash Buffer für ELISA

25 ml Wash Concentrate (20x) aufgefüllt mit Aqua dest. auf 500 ml

II.1.3.6 *Working Detector für ELISA*

48 µl Detection Antibody + 48 µl Enzym Reagent + 11,9 ml Assay Diluent

II.1.3.7 *Substrat Solution für ELISA*

BD OptEIA™ Substrate Reagent A + BD OptEIA™ Substrate Reagent B im Verhältnis
1 : 1

II.2 Patientenausschluss – Hüftkopfgewinnung

Das Patientengut bestand aus neun Patienten im Alter zwischen 57 und 82 Jahren (zwei weiblich, sieben männlich). Das Durchschnittsalter lag bei 68 Jahren.

Eine Genehmigung durch die Ethikkommission des Fachbereiches Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg lag vor: AZ 66/03.

Hierbei wurden die Patienten entsprechend den Richtlinien zur Führung einer Knochenbank auf das Vorliegen einer HIV-, Hepatitis- oder Lues-Infektion serologisch untersucht. Des Weiteren wurde eine Anamnese bezüglich einer Erkrankung, die den Knochenstoffwechsel beeinflussen könnte, erhoben. Außer einer Coxarthrose, die die Operation bedingte, wiesen alle der untersuchten Patienten keine weiteren Vorerkrankungen auf.

Die benötigten Femurköpfe wurden durch Hüftkopffosteotomie und das Knochenmark für die Zellpräparation aus dem proximalen Femur im Verlauf einer Hüftendoprothesenoperation entnommen.

II.3 Versuchsaufbau

Zur Testung der Biokompatibilität wurde eine 12-wöchige Zellkultur in Einzelwells mit einer Grundfläche von 9,62 cm² angelegt.

Für jedes der beiden Verfahren wurden vier Patienten á sechs Wells getestet. Pro Well wurden fünf Knochenstücke eines Patienten, sowie 3×10^6 Zellen aus der Knochenmarkspräparation verwendet, der Mediumwechsel (3 ml) erfolgte alle 48 Stunden.

Innerhalb der ersten vier Wochen der Zellkultur wurde jeder Mediumwechsel unter sterilen Bedingungen weiterverarbeitet (pH-Wert und Zellzahlbestimmung) und 2 ml von diesem bei -80°C eingefroren, um für die späteren Interleukinbestimmungen zur Verfügung zu stehen. In den sich anschließenden acht Wochen wurde alle 48 Stunden ein Mediumwechsel durchgeführt, allerdings nur jeder vierte zu weiteren Analysezwecken eingefroren, die übrigen wurden verworfen.

Zur Leerwertermittlung liefen je Knochenmarkspräparation I, II, III, IV, VII und VIII drei und für die Knochenmarkspräparationen V und VI je zwei Wells, die nur mit Zellen

besät wurden, außerdem je Versuchsansatz ein Well, das nur Medium enthielt, unter gleichen Bedingungen mit. Des Weiteren wurde bei drei der vier Patienten, die dem autologen Verfahren zugeordnet wurden, noch je eine Kulturschale nur mit Knochenplättchen, aber ohne weitere Zellen angesetzt.

Nach Ablauf der 12 Wochen wurden die Gewebekulturschalen aufgelöst und entsprechend der weiter vorgesehenen Auswertung (Giemsa-Färbung, Trypan-Färbung mit Bestimmung des Lebend-Tot-Verhältnisses, Raster-Elektronen-Mikroskopie oder Einbettung in Technovit) bearbeitet.

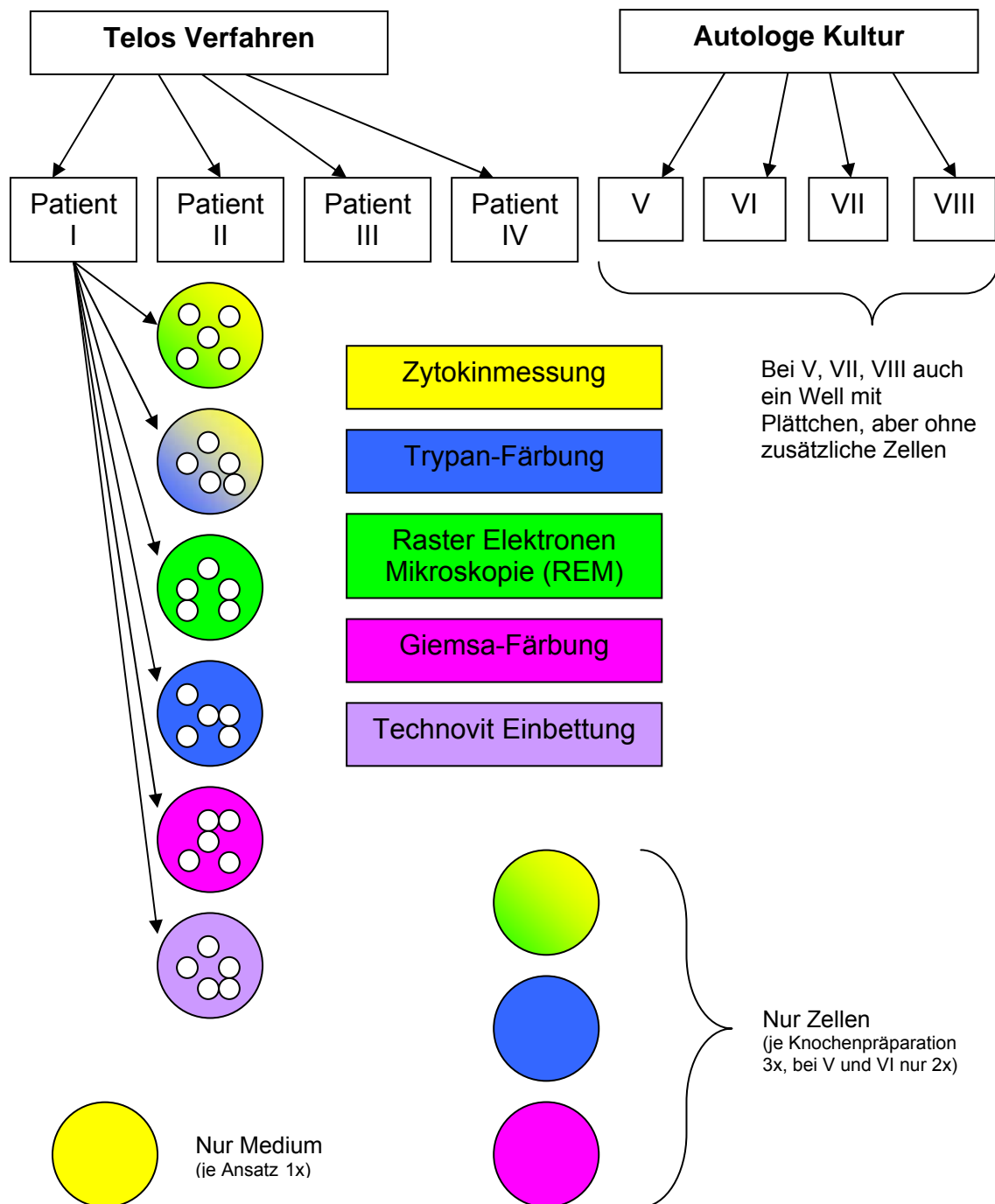


Abb. 2: Versuchsaufbau für die Zellkultur (über 12 Wochen).

II.4 Herstellung der Knochenprobenkörper

II.4.1 Präparation der Knochenplättchen

Um ein exaktes Schneiden der Probenkörper zu gewährleisten, wurden die für die Desinfektion per Wärmeverfahren bei -80°C lagernden Hüftköpfe steril verpackt langsam auf Raumtemperatur gebracht. Femurköpfe, die für das autologe Verfahren vorgesehen waren, wurden direkt nach der Entnahme aus dem OP ins Labor gebracht (eingelegt in isotonischer Lösung, NaCl 0,9 %) und sofort weiterverarbeitet, um Gewebeschäden zu vermeiden.

Im Labor erfolgten alle weiteren Arbeitsschritte weiterhin unter sterilen Bedingungen.

Für den Sägevorgang wurde der Hüftkopf in eine Greifklemme am Sägeschlitten des Trennschleifsystems wackelfrei eingespannt. Diese Befestigung ermöglicht die beliebige Ausrichtung des Hüftkopfes zu einem Diamantsägeblatt und die Herstellung von Knochenscheiben einer Planparallelität von $\pm 2\text{ }\mu\text{m}$.

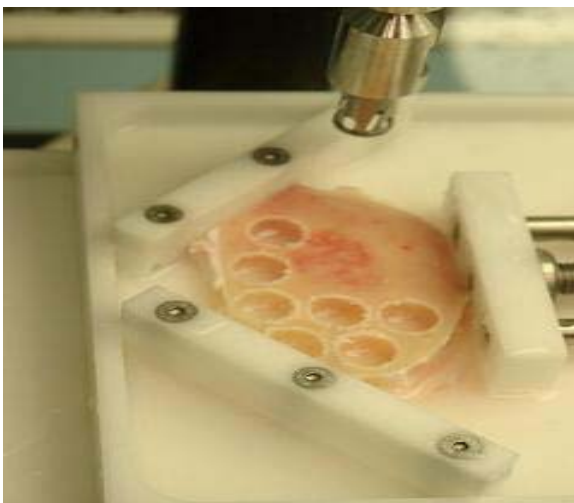
Mit dieser Bandsäge wurde der Femurkopf nun in 3 mm dicke Scheiben zerteilt, wovon die erste auf Grund ihrer Kompaktakappe verworfen wurde. Um eine präzise Schnittführung zu gewährleisten wurde der Knochenkörper hierbei durch ein am Schlitten montiertes Zuggewicht stets mit dem gleichen Druck gegen das Trennblatt gedrückt. Der Verlust durch das Sägeblatt lag pro Durchgang bei circa $350\text{ }\mu\text{m}$. Um die richtige Feineinstellung der Sägeabstände zu garantieren wurde die Stärke der Knochenscheiben nach jedem Sägedurchgang kontrolliert und dementsprechend nachjustiert. Während des Sägevorgangs wurden Sägeblatt und Schnittkanal mit auf 4°C gekühlter steriler Ringer-Lösung gespült, so dass entstehende Reibungswärme den Knochen nicht beeinträchtigte und entstehende Abriebpartikel entfernt wurden. Außerdem wurden die Knochenscheiben so vor dem Austrocknen bewahrt. Die so hergestellten Knochenscheiben lagerten bis zur sich anschließenden Weiterbearbeitung in mit Phosphat-gepufferter physiologischer Kochsalzlösung (PBS) gefüllten Petrischalen.

Aus den so gewonnenen Knochenscheiben wurden nun mit Hilfe einer Feinfräse mit Kreutztisch Plättchen geschnitten. Durch die feste Einspannung der Knochenscheiben wurden weitere Bewegungen während des Bohrvorgangs und somit Zerstörungen und Formabweichungen der erhaltenen Probenkörper verhindert. Auf Grund der

Abmessungen des diamantbesetzten Innenlochbohrers betrug der Durchmesser der entstehenden Knochenplättchen exakt 10 mm.

Um Beschädigungen durch Reibungswärme und Austrocknung zu vermeiden wurde auch bei diesem Vorgang sterile Ringer-Lösung zur Kühlung und Befeuchtung verwendet. Um Verletzungen der Knochenstruktur bzw. Herausreißen der Probenkörper aus der Knochenscheibe zu unterbinden wurde nur ein geringer Anpressdruck ausgeübt. Für die Zellkultur wurden nur einwandfreie spongiöse Knochenscheiben verwendet, fehlerhafte Plättchen oder Plättchen mit Kompaktaanteil wurden sofort verworfen.

a)



b)



Abb. 3: Bohren der Knochenplättchen

- a) Eingespannte Spongiosascheibe zur Entnahme der Knochenplättchen
- b) Hohlbohrer (Ø 10 mm)

Im Anschluss an jeden Bohrvorgang wurde der Bohreraufsatz aus dem Bohrfutter gelöst und die Knochenzylinder mit einem extra für dieses Gerät angefertigten Probenextraktor geborgen. Vor dem Folgegebrauch der Knochenplättchen wurde jedes mit einer elektronischen Schublehre auf seine exakte Stärke untersucht, wobei nur Plättchen einer Stärke $\geq 2,77$ mm und $\leq 3,00$ mm weiterhin Verwendung fanden. Die Lagerung bis zur Weiterverarbeitung erfolgte in mit PBS gefüllten Zentrifugenröhrchen.

Nach diesem Arbeitsschritt war die Präparation beendet: Man hatte homogene, spongiöse Knochenzylinder einer Stärke von $\geq 2,77$ mm $\leq 3,00$ mm und eines Durchmessers von 10 mm erhalten. Da die Größe der Femurköpfe sehr unterschiedlich

war, variierte auch die Anzahl der gewonnenen Knochenplättchen pro Hüftkopf. Im Mittel konnten 43,75 Plättchen aus einem Hüftkopf präpariert werden.

Damit eine eindeutige Identifikation der Plättchen bezüglich ihrer Herkunft gewährleistet war, wurde jedem Patienten eine römische Zahl zugeordnet, die während der gesamten weiteren Verwendung der Plättchen mitgeführt wurde und mit der verwendete Utensilien und Probenröhrchen beschriftet wurden.

II.4.2 Aufbereitung der Probenkörper

II.4.2.1 Telos

Anschließend an die Präparation wurden die Knochenplättchen, welche für die Desinfektion nach dem Telos-Verfahren vorgesehen waren, vor der Lagerung noch mit einem Jet-Lavage-System (unter sterilen Bedingungen, Ringer-Lösung) durchgespült, um zwischen den Trabekeln vorhandenes Fett und Zellen zu entfernen. Dies geschah, um eine möglichst genaue Angleichung an die normale Bearbeitung von allogenen Knochentransplantaten aus fremden Hüftköpfen zu erreichen.

Bis zur Desinfektion im Rahmen des Telos-Verfahrens wurden die gereinigten Knochenplättchen bei -80°C in sterilen Gefäßen eingefroren.

II.4.2.2 Autolog

Frisch zugeschnittene Knochenplättchen für das autologe Verfahren wurden vor ihrer Verwendung in der Zellkultur noch gewaschen, um vorhandene Abriebpartikel und potentielle Infektionserreger zu entfernen bzw. unschädlich zu machen.

Hierzu wurden sie im ersten Schritt in zwei je 35 ml PBS enthaltende Zentrifugenröhrchen (à 50 ml) aufgeteilt. Zur Intensivierung des Reinigungseffektes wurden die Zentrifugenröhrchen mit den Probenkörpern für 10 Minuten bei 25 Umdrehungen pro Minute in einem Rotator „Reax2“ geschwenkt.

Anschließend wurde die gebrauchte PBS verworfen und die Plättchen in zwei je 35 ml Earles Salt Solution beinhaltende Zentrifugenröhrchen überführt und wieder für 10 Minuten in den Rotator bei 25 Umdrehungen pro Minute eingespannt.

Danach wurde das Waschmedium wiederum verworfen und die Prozedur mit Earles Salt Solution wiederholt, so dass eine Waschzeit von insgesamt 20 Minuten in Earles Salt Solution resultierte.

Für den vierten und letzten Waschgang wurden die Knochenplättchen erneut in neue Zentrifugenröhrchen umgesetzt, allerdings wurde der Earles Salt Solution diesmal zusätzlich

2 mg Amphotericin B,

250 000 IE Penicillin mit 250 000 IE Streptomycin sowie

100 mg Gentamicin

zugesezt. Anschließend wurden die Zentrifugenröhrchen für 20 Minuten und 25 Umdrehungen pro Minute in den Rotator eingespannt.

Nach Beendigung dieses letzten Waschschriffs waren die Knochenplättchen bereit für die Zellkultur, ein weiteres Reinigungs- bzw. Sterilisationsverfahren schloss sich bei diesen Proben für das autologe Verfahren nicht mehr an.

II.5 Desinfektionsverfahren

II.5.1 Telos

Beim Telos-Verfahren wurden die gesäuberten Knochenplättchen eines Patienten nach dem Auftauen steril in ein Metallei, welches mit mehreren kleinen Löchern versehen war, überführt und in einen sterilen mit 250 ml Ringer-Lösung gefüllten Macrolon-Kunststoffbehälter gegeben, der in den Lobator-2 gestellt und dem standardisierten Erwärmungsprozess ausgesetzt wurde. Die Erwärmung erfolgte unter dem permanenten Rühren der Ringer-Lösung durch einen im Gerät integrierten Magnetrührer. Die Temperaturkontrolle erfolgte durch den geräteeigenen Temperaturanzeiger. Bei zwei der vier Patienten wurde zur Kontrolle des Erwärmungsprozesses unter den im Versuchsaufbau gegebenen Bedingungen eine zusätzliche externe Temperaturüberwachung durchgeführt. Hierbei zeigte sich die gleiche Temperaturkurve, wie sie unter klinischen Bedingungen im Zentrum der Hüftköpfe ermittelt wurde. Diese Temperaturmesssonden wurden durch den Gummiverschluss des

Lobatorgefäßes bis in das Metallei mit den Probenkörpern geführt, um auch die tatsächliche Temperatur an den Probenkörpern aufzuzeichnen.

Während dieses 94-minütigen Prozesses wurde das Gefäß erhitzt, so dass eine Kerntemperatur von 82,5°C über einen Zeitraum von mindestens 30 Minuten erreicht wurde. Anschließend wurden die Ringer-Lösung über einen speziellen Entsorgungsbehälter entnommen und die Probenkörper bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

Wichtig hierbei war, dass die angestrebte Inaktivierungstemperatur und -zeit auch im Zentrum erreicht wurde.

II.6 Zellkultur

II.6.1 Knochenmarkspräparation

Patienten :

Für die Knochenmarkspräparation bestand das Patientengut aus fünf gesunden Patienten (1 weiblich und 4 männlich) im Alter zwischen 63 und 78 Jahren, die „nur“ an einer Coxarthrose litten. Alle Patienten waren zur Knochenspende vorgesehen und hatten eine Eigenblutspende durchgeführt, wodurch die serologische Testung der Patienten gewährleistet war.

Die markhaltigen Knochenblöcke von etwa 8 x 10 x 20 mm wurden während der Primärimplantation von Totalendoprothesen der Hüfte nach Femurkopfosteotomie aus dem proximalen Femurschaft steril entnommen.

Das intraoperativ gewonnene Spongiosastück wurde bis zur weiteren Bearbeitung im Labor in einem sterilen Behälter mit liqueminhaltigen Phosphatpuffer transportiert und aufbewahrt, um eine Austrocknung oder Blutgerinnung zu verhindern.

Die weiteren Arbeitsschritte fanden unter einer Sterilwerkbank unter sterilen Bedingungen statt.

Es folgte die mechanische Zerkleinerung des Spongiosablocks mit Hilfe einer sterilen Schnabelzange. Das so zerkleinerte Material wurde mit insgesamt 160 ml PBS aufgenommen und die erhaltene Suspension durch ein Feinsieb der Maschenweite 0,1

mm von spongiösen Knochenteilen getrennt. Danach wurden je 8 ml der so erhaltenen Zellsuspension auf je 4 ml eines Dichtegradientens

28 ml Biocoll Separating Solution, Dichte 1,077 und

56 ml Histopaque[®], Dichte 1,119

geschichtet und 20 Minuten bei 2200 Umdrehungen pro Minute und 10°C ohne Bremse zentrifugiert.

Nach dem Abpipettieren der Interphase wurde diese aus fünf kleinen in ein großes Zentrifugenröhrchen überführt, mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und erneut 10 Minuten bei 2200 Umdrehungen pro Minute und 10°C zentrifugiert. Dieser Spülvorgang wurde noch zweimal wiederholt. Nach dem letzten Spülvorgang wurde der Überstand wieder abgesaugt und die verbleibende Zellsuspension in 50 ml Kulturmedium (IMDM) aufgenommen.

Mittels Casy[®] 1 TTC wurde die Zellzahl im Medium ermittelt.

II.6.2 Kulturbedingungen

Am Tag der Knochenmarkspräparation wurden die Zellen steril in Einzelwells ausgesät. Pro Einzelwell (9,62 cm²) wurden 3 Mio. Zellen mit 3 ml IMDM Medium ausgesät, dies entspricht 311850 Zellen/ cm².

Zuvor wurden in den Wells die Knochenprobenkörper ausgelegt, so dass sie mit den Zellen beimpft werden konnten.

In einem Well pro Patient wurde ein rundes Deckglas auf den Boden gelegt, um im Anschluss an die Zellkultur eine rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der auf dem Boden wachsenden Zellen zu ermöglichen.

Die Zellen wurden 12 Wochen bei 37°C, 12,5 % O₂ und 5 % CO₂ kultiviert.

Das Medium wurde alle 48 Stunden durch Abpipettieren des Überstandes und Ersatz durch neues IMDM gewechselt. Ab dem zweiten Mediumwechsel wurden die humanen rekombinanten Wachstumsfaktoren Interleukin-3 (IL-3) und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender-Faktor (GM-CSF) jeweils in einer Konzentration von 10 ng/ ml (Konzentration der Stammlösung, d.h. 1 ml für 40 ml IMDM Medium) dem Medium zur Stimulation der Zellkultur zugesetzt [Kalla et al 1991, 1992; Wilke et al 1993, 1995, 1998].

Durch ein Durchlichtmikroskop wurden während der 12 Wochen jeden zweiten Tag die Zelldichte, das Anwachsverhalten und die Differenzierung der Zellen beobachtet.

II.6.3 Probenverarbeitung und -lagerung

Nach Abnahme des Mediumüberstandes (3 ml) beim Mediumwechsel in sterile Zentrifugenröhrchen wurde dieser bei 2200 Umdrehungen in der Minute und 10°C 10 Minuten lang ohne Bremse zentrifugiert. Dadurch bildeten die mit dem Medium abgeschöpften Zellen ein Pellet am Boden der Röhrchen, so dass im nächsten Schritt deren Zahl bestimmt werden konnte.

Dann wurden 2 ml in ein steriles Eppendorf Tube abgenommen und dieses nach Beschriftung, die garantiert, dass die Probe stets dem Desinfektionsverfahren, dem Patienten, dem Well und dem Mediumwechsel zugeordnet werden kann, bei -80°C eingefroren.

II.6.3.1 pH-Bestimmung

Es folgte in dem verbleibenden Milliliter eine digitale pH-Bestimmung, um weiteren Aufschluss über die Kultur- und Wachstumsbedingungen zu erhalten.

II.6.3.2 Zellzahlmessung

Eine Zellzahlmessung zur Beurteilung der Zellzahlentwicklung während der Kultur erfolgte unter Nutzung des Casy[®] 1 TTC zum einen nach jedem Mediumwechsel, zum anderen bei Auflösung der Wells.

Im ersten Fall wurde die Zellzahl nach Aufschütteln des Milliliters Medium, der nach jedem Mediumwechsel im Zentrifugenröhrchen verblieb, gemessen. Die so erhaltene Zellzahl gibt wieder, wie viele Zellen durch den Mediumwechsel aus dem Well gesaugt wurden.

Im zweiten Fall wurde nach Ende der Kultur das Medium abgesaugt und die im Schälchen verbliebenen Zellen mit 2 ml Trypsin-Lösung gelöst. Nach mehrmaliger Spülung mit PBS wurde die vollständige Ablösung der Zellen unter dem Lichtmikroskop kontrolliert und die Zellzahl bestimmt.

II.7 Enzymbestimmungen

Aus den eingefrorenen Proben wurden die Enzyme Alkalische Phosphatase, Lactat und Lactatdehydrogenase bestimmt. Den Leerwert lieferte jeweils eine Messung der Proben, die nur aus Medium bestanden.

II.7.1 Alkalische Phosphatase (AP)

Die AP wurde photometrisch bei 415 nm Wellenlänge bestimmt. Hierbei wurde p-Nitrophenol gemessen, welches in Gegenwart von Magnesium- und Zinkionen durch Phosphatasen von P-Nitrophenylphosphat abgespalten wurde. Die Messung erfolgte im Zentrallabor des Klinikums gemäß der SOP AM-ZL-123/C.

II.7.2 Lactat

Das Lactat der Proben wurde im Zentrallabor mittels enzymatischen Farbtests bestimmt. Wasserstoffperoxid, das während der enzymatischen Oxidation (Lactatoxidase) von Lactat zu Pyruvat entstand, wurde mit Peroxidase zu einem Farbstoff umgesetzt, dessen Intensität der Lactatkonzentration proportional war (SOP AM-ZL-127/C).

II.7.3 Lactatdehydrogenase (LDH)

Zur Bestimmung der LDH-Aktivität wurde die Extinktionszunahme bei 340 nm im Reaktionsgemisch ermittelt, welche durch die NADH-Bildung während der Umwandlung von Lactat zu Pyruvat durch LDH zustande kommt (SOP AM-ZL-122/C).

II.8 Bestimmung der Zytokine

Aus den während des Langzeitversuchs eingefrorenen Proben wurden die Konzentrationen der Zytokine IL-1 β , IL-6, TNF α und IFN γ mittels ELISA-Methode ermittelt.

II.8.1 Ansetzen der Stock Standards am Beispiel von IL-1 β

Das Lyophilisat wurde in 1 ml Aqua dest. gelöst und gemischt, danach wurde der erhaltene Stock Standard (100 ng/ ml) in Portionen á 50 μ l pro Eppendorf-Cup aliquotiert (= 5 μ g IL-1 β / Cup). Die Lagerung erfolgte bei -80°C über maximal 6 Monate.

II.8.2 Ansetzen der Standardverdünnungsreihe am Beispiel von IL-1 β

Als Standardverdünnung wurden 45 μ l Stock Standard von IL-1 β mit 4495 μ l Assay Diluent gemischt (= 1 μ g/ ml) und anschließend eine Verdünnungsreihe (500 pg – 250 pg – 125 pg – 62,50 pg – 31,25 pg – 15,63 pg – 7,81 pg) aus den Stockstandards hergestellt.

II.8.3 Arbeitsschritte ELISA

(Alle Antikörper und spezifischen Reagenzien wurden entsprechend dem zu bestimmenden Interleukin gewählt.)

Die Microtiterplatte wurde mit je 100 μ l Capture Antibody + Coating Buffer (Verhältnis 1 : 250) pro Vertiefung beschichtet, anschließend erfolgte die Inkubation über Nacht bei 4°C.

Am folgenden Tag der Messung wurde die Platte geleert auf Zellstoff ausgeklopft und anschließend dreimal mit je 300 μ l Wash Buffer pro Vertiefung gewaschen.

Es folgte die Inkubation mit 200 µl Assay Diluent pro Vertiefung über eine Stunde bei Raumtemperatur.

Nach der Inkubation wurde die Platte wieder dreimal mit je 300 µl Wash Buffer pro Vertiefung gewaschen.

Es folgte das Aufbringen von je 100 µl der Standardverdünnungsreihe bzw. der Proben, die zuvor bei Raumtemperatur aufgetaut und vor der sterilen Entnahme gevortext wurden, in jeweils zwei Vertiefungen pro Probe bzw. Verdünnung (Doppelbestimmung). In 2 Vertiefungen wurde nur Assay Diluent zur Leerwertbestimmung gegeben. Die so vorbereitete Platte wurde über zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach der Inkubation wurde die Platte fünfmal mit je 300 µl Wash Buffer pro Vertiefung gewaschen.

Nach dem Waschvorgang wurden die Vertiefungen mit je 100 µl Working Detector befüllt und verdeckt für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Es folgte ein siebenmaliger Waschvorgang mit je 300 µl Wash Buffer je Vertiefung.

Nun wurden je 100 µl Substrat Solution in die Vertiefungen gegeben und die Platte über 30 Minuten im Dunkeln inkubiert.

Nach exakt 30 Minuten wurden in jede Vertiefung 50 µl Stop-Lösung gegeben und die Lichtabsorption der Proben innerhalb von 30 Minuten bei 570 nm – 450 nm Wellenlänge im Absorptionsphotometer gemessen.

Der verwendete Capture-Antibody war spezifisch für das zu testende Interleukin (= Antigen), wodurch sich die hohe Spezifität der Messung für das entsprechende Interleukin ergab.

Der „Detection Antibody“ (biotinylierte Antikörper gegen das entsprechende Interleukin) wurde zuvor mit einem Enzym (Avidin-horseradish peroxidase) konjugiert und ging im nächsten Schritt mit den gebundenen Interleukinen eine Bindung nach dem

Sandwichprinzip ein. Dieses Enzym katalysierte die Entwicklung eines Farbstoffes durch die im nächsten Schritt zugegebenen Chemikalien (Wasserstoff-Peroxid und 3, 3', 5, 5' Tetramethylbenzidin). Nach Zugabe einer Stop-Solution (1 M Phosphorsäure) wurde die Absorption bestimmt, diese korrelierte proportional mit der Konzentration des gesuchten Interleukins in der Probe.

Der Messbereich lag bei den verwendeten ELISA-Sets für IL-6 bei 5 – 150 pg/ ml, für IL-1 β bei 8 – 500 pg/ ml, für IFN γ bei 5 – 150 pg/ ml und für TNF α bei 4 – 250 pg/ ml. Auf Grund der teils sehr hohen Werte bei einigen Proben, die den Messbereich überschritten, wurden Verdünnungen mit einer speziellen Verdünnungslösung hergestellt.

II.9 Rasterelektronenmikroskopie

Proben, die mit Hilfe des Raster Elektronen Mikroskops untersucht werden sollten (Deckgläser des Langzeitversuchs und Knochenplättchen), wurden nachdem das Medium abgesaugt war nach folgender Methode fixiert.

II.9.1 Knochenplättchen

Für die Primärfixation wurden 2 g Paraformaldehydpulver in 25 ml heißem destillierten Wasser unter dem Abzug gelöst. Bis zum Erreichen des Neutralpunktes wurde dieser Aufschlämmung NaOH zugesetzt, woraufhin sich das Paraformaldehyd löste. Nach dem Abkühlen wurde dieser Lösung 10 ml 25 %iges Glutaraldehyd und 15 ml 0,2 M Kakodylatpuffer (21,4 g Kakodylsäurenatriumsalz ad. 500 ml, pH 7,4) zugesetzt. Diese Lösung wurde vor Gebrauch mit Kakodylatpuffer 1 : 1 verdünnt.

In diesem Glutaraldehyd-Formaldehyd-Gemisch wurden die Knochenzylinder bei 4° – 6°C über 24 Stunden fixiert. Es folgten vier Waschgänge mit 0,2 M Kakodylatpuffer.

Anschließend wurden die Knochenproben für sechs Stunden in eine 2 %ige Osmiumtetroxid-Lösung in 0,1 M Kakodylatpuffer bei Raumtemperatur gegeben. Vier Waschgänge mit destilliertem Wasser schlossen sich an.

Jetzt wurden die Proben einer aufsteigenden Acetonreihe (50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 90 %, 100 % für jeweils 20 Minuten) zugeführt, an deren Ende sie in 100 %igem Aceton gelagert wurden.

II.9.2 Deckgläser mit Zellen

Die Zellen wurden in einer Fixierlösung aus 0,2 M Kakodylatpuffer, Aqua dest. und 25 %iger Glutaraldehyd-Lösung (im Verhältnis 4,6 : 4,6 : 0,8) für zwei Stunden fixiert. Daraufhin folgten drei Waschgänge von je 10 Minuten mit 0,1 M Kakodylatpuffer.

Die sich anschließende Fixation in 2 %iger Osmiumtetroxid-Lösung in 0,1 M Kakodylatpuffer dauerte drei Stunden. Auch hier folgten vier Waschgänge mit destilliertem Wasser und die aufsteigende Acetonreihe mit anschließender Verwahrung in 100 %igem Aceton.

Beiden Probensorten für die Rasterelektronenmikroskopie gemein war die spätere Trocknung in der Critical Point Kammer und die Bedampfung mit Gold (Schichtdicke circa 20 nm, 1,3 Minuten bei einer Spannung von 1,2 kV und einer Stromstärke von 40 mA) im Sputter-Coater. Bis zur mikroskopischen Untersuchung mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops wurden die bedampften Proben im Exikator verwahrt.

II.10 Färbungen

II.10.1 Giemsa

Um einen Eindruck des Einwachsens der ausgesäten Zellen in die Knochenprobenkörper zu gewinnen, wurde eine Giemsa-Färbung durchgeführt. Durch sie wurde mineralisierte Matrix rosa bis zartrosa, Kollagen rosa, Osteoid blassblau sowie Zellen und Zellkerne unterschiedlich blau angefärbt.

Die Proben wurden vor der Färbung nach Entfernen des Mediumüberstandes mit 4 %iger Formalinlösung fixiert (2 x täglich wechseln über sechs Tage).

Färbevorschrift :

Nach Entfernung des 4 %igen Formalins wurden die Wells dreimal mit Aqua dest. gewaschen.

Danach folgten drei weitere Waschgänge mit Aqua dest., wobei dieses für je 15 Minuten im Well belassen wurde.

Darauf folgte die Färbung mit einer 4 %igen Giemsa-Lösung (jeweils vor Gebrauch aus 4 ml käuflicher Giemsa-Gebrauchs-Lösung mit 96 ml dest. Wasser frisch angesetzt) über 30 Minuten.

Nach dem Absaugen der Färbelösung wurde dann mehrmals mit Aqua dest. mit 1 – 2 Tropfen Eisessig zur Differenzierung gespült bis keine Farbwolken mehr entstanden.

Anschließend wurden die Präparate staubgeschützt an der Luft getrocknet.

II.10.2 Trypan mit Zellzählung

Für die Trypanfärbung, welche eine Differenzierung zwischen lebenden (hell) und toten (dunkel = Farbstoff eingedrungen) Zellen ermöglicht, wurde das Medium aus den Wells abgenommen und in einem Zentrifugenröhrchen gesammelt. Das Well wurde zweimal mit PBS gespült und die Spüllösung ebenfalls im Zentrifugenröhrchen gesammelt. Unter Zusatz von 2 ml Trypsin-Lösung wurden unter mikroskopischer Kontrolle die restlichen Zellen abgelöst und in das Sammelröhrchen überführt. Es folgte eine Spülung mit der Sammellösung und zweimalige Spülung mit PBS, wobei die jeweils abgesaugten Überstände wieder gesammelt wurden. Die erhaltene Zellsuspension im Zentrifugenröhrchen wurde 10 Minuten bei 2200 Umdrehungen pro Minute und Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Danach wurde die überstehende Flüssigkeit abpipetiert und das Zellpellet mit einem Milliliter PBS resuspendiert und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Dieses wurde erneut fünf Minuten bei 1600 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das erhaltene Zellpellet wurde anschließend in 80 µl 0,5 %iger Trypanblau-Lösung aufgenommen. Mit der so angefärbten Zellsuspension wurde eine Neubauer-Zählkammer gefüllt und diese unter dem Mikroskop ausgezählt.

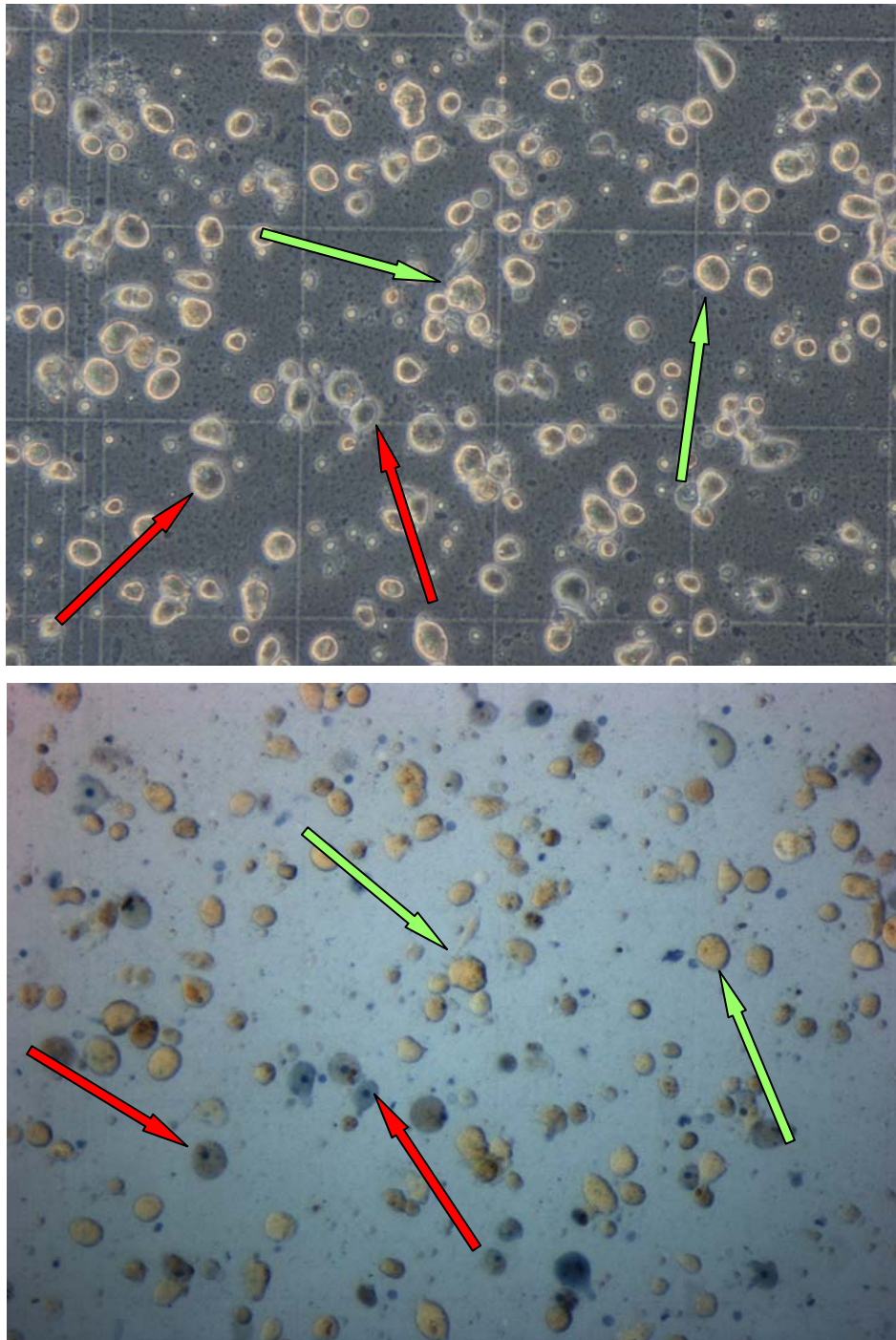




Abb. 4: Trypanfärbung einer Zellkultur nach 12 Wochen Kulturdauer. In 100facher Vergrößerung; deutlich ist der Unterschied zwischen vitalen und avitalen Zellen zu erkennen (CZ2 uro).

 = vitale Zellen
 = tote Zellen

II.10.3 Basische Fuchsinfärbung

Knochenplättchen, die später in Technovit eingebettet werden sollten, wurden teilweise zuvor mit basischem Fuchsin gefärbt. Dieses färbt reifes, voll mineralisiertes Knochengewebe nicht an, Zellkerne und vitale Zellen färbt es rot.

Färbeanweisung :

Die Knochenplättchen wurden nach Entnahme aus der Zellkultur in 0,5 % basisches Fuchsin in 40 %igen Alkohol gegeben und zwei Tage auf den Schüttler Swip KS-10 bei 50 Bewegungen pro Minute gestellt. Dieser Schritt wurde mit 0,5 % basischen Fuchsin in 60- und 70 %igem Ethanol wiederholt. Anschließend wurden die Proben einer aufsteigenden Alkoholreihe (80 %, 90 %, 100 % Ethanol für je zwei Tage) zugeführt und die Proben dann in 100 %iges Methanol gelegt. Es folgten die Schritte der Technoviteinbettung nach der Alkoholreihe (siehe dort).

II.11 Technoviteinbettung

Die Knochenprobenkörper wurden aus der Zellkultur in eine 10 %ige gepufferte Formalinlösung (angesetzt aus dest. Wasser und 37 % Formaldehydlösung) überführt. Dies erfolgte in flüssigkeitsdurchlässigen Kunststoffkörbchen. Eine Beschriftung ermöglichte die spätere Zuordnung zu jedem Well. Nach dreitägiger Fixation auf einem Schüttler bei 50 Bewegungen pro Minute, während der das 10 %ige Formalin täglich gewechselt wurde, wurden die Proben über Nacht unter fließend Leitungswasser gewässert und anschließend einer aufsteigenden Alkoholreihe (50 % – 70 % – 80 % – 90 % – 90 % – 100 % – 100 %, jeweils ein Tag auf dem Schüttler) zugeführt. Eine längere Verweildauer in einem der Intermedien war problemlos möglich, doch sollte kein Schritt ausgelassen werden.

Nach einem weiteren Tag in 100 % Methanol wurden sie (wie auch die Proben der basischen Fuchsinfärbung) zur Entfettung in 100 % Xylol umgesetzt, wo sie zwei Tage (täglicher Xylolwechsel) verblieben.

Die anschließende Einbettung erfolgte nach den Vorgaben für Technovit 9100 Neu der Firma Kulzer. Hierfür wurden die Knochenplättchen aufrecht in Kunststoffzylinder

gestellt und diese mit der Einbettlösung vollständig gefüllt, so dass auch nach einer etwa 15 %igen Polymerisationsschrumpfung noch ein ausreichender Sockel für die Einspannung in das Mikrotom verblieb. Entsprechend der enthaltenen Probe wurde im oberen Bereich noch ein Etikett eingelassen, um die Probe später identifizieren zu können. Zur Ableitung der entstehenden Polymerisationswärme wurden die verschlossenen Kunststoffzylinder in einen bereits auf -15°C vorgekühlten Metallblock gesteckt und bei -15°C zur Einbettung gelagert.

Nach fertiger Auspolymerisation wurden von diesen in Kunststoffblöcke eingeschlossenen Knochenplättchen mit einem Hartschnittmikrotom histologische Schnitte abgehobelt. Schnittgeschwindigkeit und Schnittdicke waren hierbei frei wählbar. Bis zum Zentrum des Knochens wurde mit einem Abhub von 25 µm und hohen Geschwindigkeiten vorgeschritten. Für die eigentlichen Präparate wurde mit drei Schnitten pro Minute und einer Schnittdicke von 5 µm gearbeitet, wobei mit einem feinen Pinsel stets reichlich 70 %iges Ethanol auf die entstehenden Präparate aufgetragen wurde, so dass sie vom Messer abschwammen und sich nicht einrollten. Diese auf die Oberkante des Messers gezogenen Schnitte wurden auf Objektträger übertragen, die zuvor mit einer Ponal – Lösung über 10 Minuten beschichtet worden waren. Hier wurden die Präparate noch einmal mit 70 %igen Ethanol beträufelt und gestreckt, es folgte die Auflage einer dünnen Polyethylenfolie und Entfernung des überschüssigen Alkohols durch Ausstreichen mit zwei Tupfern. Anschließend wurden die Objektträger mit Löschpapierstreifen in eine selbst konstruierte Presse geschichtet und für 48 Stunden bei 50°C unter handfestem Druck im Wärmeschrank getrocknet. Die Betrachtung der Präparate unter dem Mikroskop geschah nach Eindeckung mit Entellan.

II.12 Statistik

Zur Evaluation der Signifikanz der durch Messung der Interleukine, Enzyme und Zelldifferenzierung erhaltenen Daten, die einer Normalverteilung entsprachen, fand der t-Test für unverbundene Stichproben nach Student Anwendung. Dieser Test ermöglicht den Vergleich der Mittelwerte zweier unterschiedlich großer Stichprobenräume.

Die Teststatistik errechnet sich hierbei aus: $T = \frac{\bar{y} - \bar{x}}{s_p} \cdot \sqrt{\frac{m \cdot n}{m + n}}$

T = Prüfgröße

\bar{y}, \bar{x} = Mittelwerte der beiden Gruppen

m = Anzahl der Werte in der Kontrollgruppe

n = Anzahl der Werte in der Prüfgruppe

$s_p^2 = \frac{(m-1) \cdot s_x^2 + (n-1) \cdot s_y^2}{m + n - 2}$ = gepoolte Varianz

s_x^2, s_y^2 = Varianzen der Messreihen x und y

Bei der weiteren Auswertung wird noch die Anzahl der Freiheitsgrade benötigt:

$$f = m + n - 2$$

Liegt nun der errechnete Wert T über dem „kritischen Wert“ t für die entsprechende Anzahl der Freiheitsgrade f , so besteht eine Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe.

Rechenbeispiel:

IL-6 Spiegel bei der Kontrollkultur „nur Zellen“ und der autologen Messreihe am Tag des vierten Mediumwechsels:

Kontrollkultur Mediumwechsel 4:

C Z 2	892,878
C V Z 1	490,938
C VI Z 2	517,566
C VII Z 2	824,964
C VIII Z 2	110,112
Zellen	224,040
Cells	451,060
Mittelwert Zellen (pg / ml)	501,651
Standardabweichung	286,032639

autolog Mediumwechsel 4:

C V 2	475894,123
C V 3	377778,986
C VI 2	377041,080
C VI 6	303471,064
C VII 2	352874,002
C VII 4	489959,686
C VIII 2	263143,582
C VIII 3	327669,654
Mittelwert autolog (pg / ml)	370979,022
Standardabweichung	78953,7518

$$m = 7$$

$$\bar{x} = 502 \text{ pg / ml}$$

$$s_x = 286,0$$

$$n = 8$$

$$\bar{y} = 370979 \text{ pg / ml}$$

$$s_y = 78953,8$$

$$s_p = \sqrt{\frac{(m-1) \cdot s_x^2 + (n-1) \cdot s_y^2}{m+n-2}} = \sqrt{\frac{(7-1) \cdot (286,0)^2 + (8-1) \cdot (78953,8)^2}{7+8-2}}$$

$$s_p = 57936,576$$

$$T = \frac{\bar{y} - \bar{x}}{s_p} \cdot \sqrt{\frac{m \cdot n}{m+n}} = \frac{370979 - 502}{57936,576} \cdot \sqrt{\frac{7 \cdot 8}{7+8}} = \underline{\underline{12,355}}$$

$$\text{Freiheitsgrade: } f = 7 + 8 - 2 = 13$$

Kritischer Wert t bei verschiedenen Sicherheitsgraden:

Freiheits- grad f	Statistische Sicherheit $S = 1 - \alpha/2$						
	90%	95%	97,50%	99%	99,50%	99,90%	99,95%
12	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	3,93	4,318
13	1,35	1,771	2,16	2,65	3,012	3,852	4,221
14	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	3,787	4,14

T ist somit größer als der „kritische Wert“ t bei einem Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ ($t_{f, 1-\alpha/2} = 2,160$) bei der entsprechenden Anzahl der Freiheitsgrade f . Somit ist das Ergebnis in diesem Fall signifikant.

$p > 0,05$	=	„nicht signifikant“,
$p \leq 0,05$	=	„signifikant“,
$p < 0,01$	=	„sehr signifikant“,
$p < 0,001$	=	„hochsignifikant“.

III. Ergebnisse

III.1 Zellkultur ohne Knochenprobenzusatz (Kontrolle)

Während der 12-wöchigen Zellkultur zeigten die Knochenmarkszellen ein gutes Proliferationsverhalten und bildeten nach circa 14 Tagen einen dichten Zellrasen im Plastikwell.

Im Rahmen der Zellkultur wurde zum Zeitpunkt von Mediumwechsel 1 – 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38 und 42 eine Zellzählung, pH-Wert-, Enzym- und Interleukinbestimmung im abgenommenen Mediumüberstand durchgeführt.

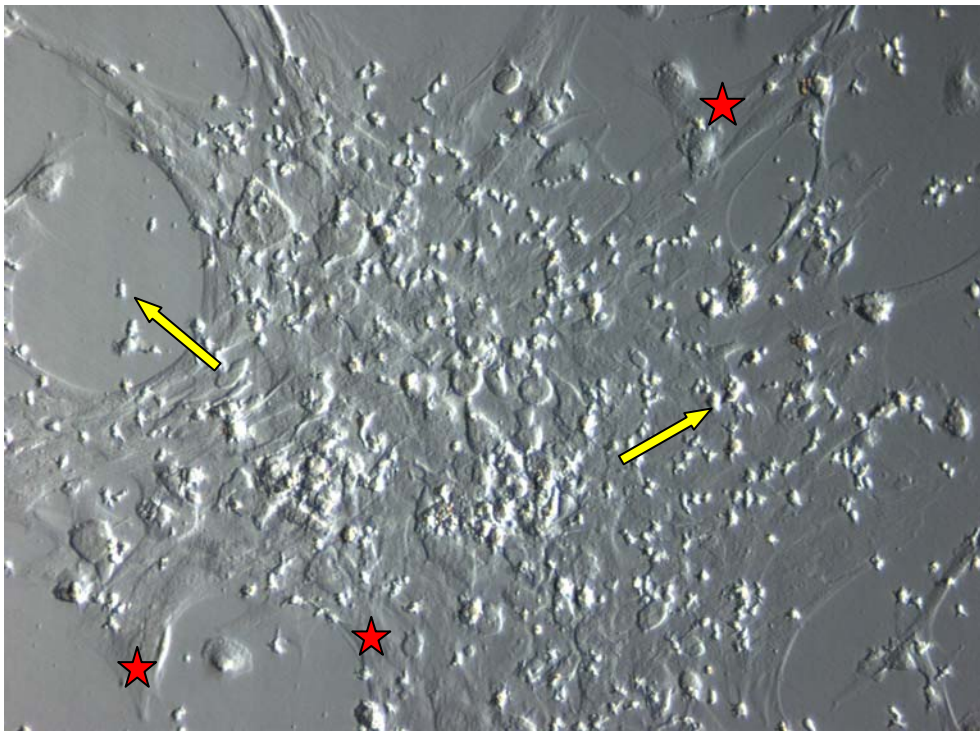


Abb. 5: Lichtmikroskopische Kontrolle der humanen Knochenmarkszellkultur (im Well bei 100facher Vergrößerung; ★ = adhärenente Zellen; → = nicht adhärenente Zellen; Kulturdauer: 14 Tage).

III.2 Zellkultur unter Knochenprobenzusatz

Bei den Zellkulturen über 12 Wochen unter Zusatz von Knochenproben wurden zum Zeitpunkt von Mediumwechsel 1 – 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38 und 42 eine Zellzählung, pH-Wert-, Enzym- und Interleukinbestimmung im abgenommenen Mediumüberstand durchgeführt.

III.2.1 Zellkultur auf „Telos“-Knochenplättchen

Während der 12-wöchigen Zellkultur zeigten die Knochenmarkszellen ein gutes Proliferationsverhalten. Innerhalb der ersten Woche setzten sich die Zellen auf dem Boden der Zellkulturschale ab und bildeten dort nach circa 14 Tagen einen dichten Zellrasen.

Hierbei begannen sie vor allem zwischen den einzelnen Knochenplättchen einen Zellrasen zu bilden und fixierten diese so im Verlauf der Kultur immer stärker in der Zellkulturschale.

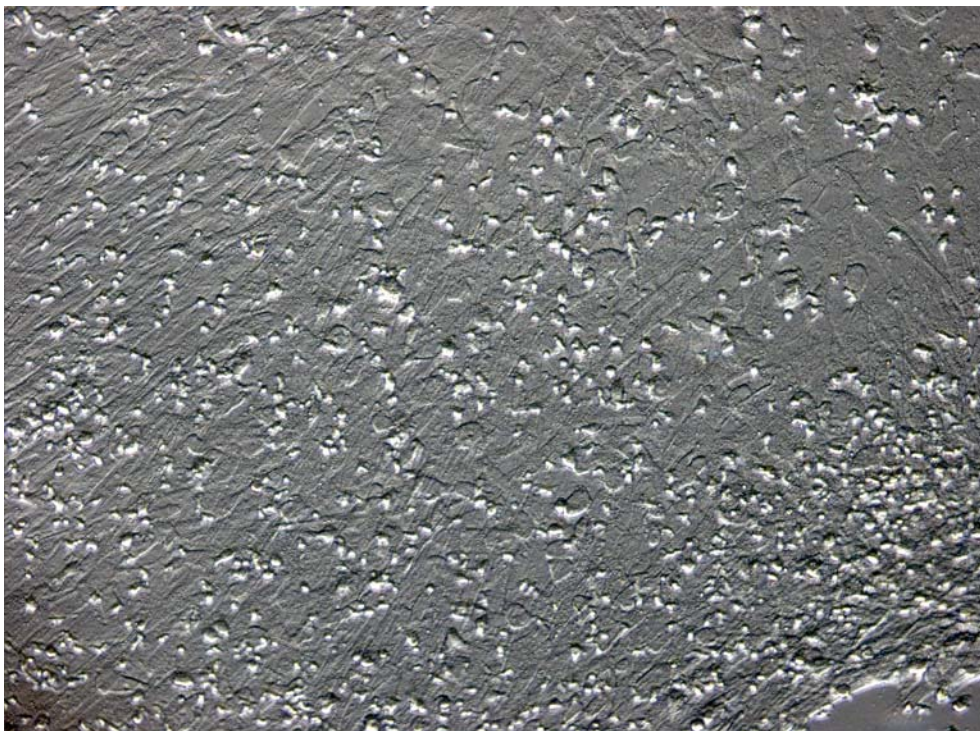


Abb. 6: Zellrasen nach 16 Tagen Kulturdauer (in 100facher Vergrößerung, CI3-8-100).

Auch wuchsen die Zellen sowohl zwischen den Trabekeln der einzelnen Knochenplättchen, als auch zwischen den Plättchen selbst, die sie fest miteinander verbanden.

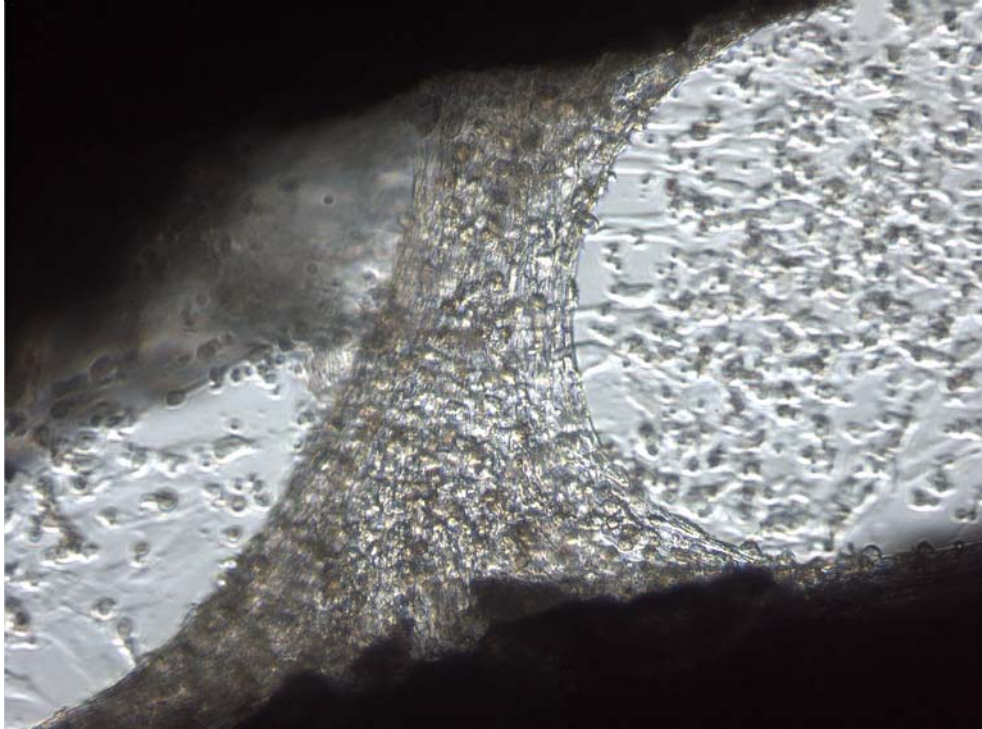


Abb. 7: Verbindung zweier Knochenplättchen nach 34 Tagen Zellkultur (in 100facher Vergrößerung, CIV3-17-100).

III.2.2 Zellkultur auf autologen Knochenplättchen

Auch bei der Zellkultur „autolog“ zeigten die Knochenmarkszellen ein gutes Proliferationsverhalten und setzten sich innerhalb der ersten Woche auf dem Boden der Zellkulturschale ab. Jedoch dauerte die Ausbildung eines dichten Zellrasens hier etwas länger als 14 Tage.

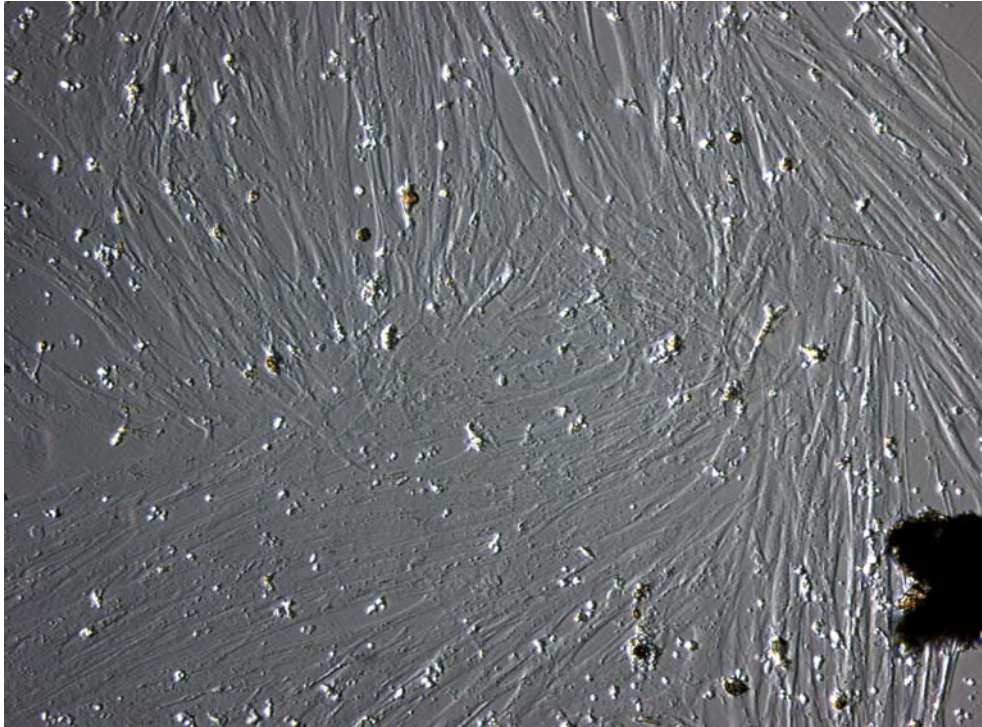


Abb. 8: Zellrasen der Zellkultur „autolog“ nach 20 Tagen Zellkultur (in 100facher Vergrößerung, CVI2-10-100(2)).

III.3 pH-Werte während der 12-wöchigen Zellkultur

Der pH-Wert wurde jeweils direkt nach Abnahme des Mediums am Tag des jeweiligen Mediumwechsels bestimmt. Die angegebenen Werte stellen Mittelwerte dar, die bei den Angaben für „nur Medium“ und „nur Zellen“ aus je fünf, bei „Telos“ und „autolog“ aus je acht Werten errechnet wurden.

Besonders auffällig stellen sich hier die pH-Werte bei der autologen Zellkultur dar, da sie von Beginn an sehr niedrig sind (1. Mediumwechsel: $\text{pH} = 7,22$) und sich über den Zeitraum der Zellkultur kaum verändern (Differenz zwischen höchstem und niedrigstem Mittelwert: 0,21 – bei der Zellkultur „Telos“: 0,47).

Bei den Zellkulturen „nur Zellen“ und „Telos“ lässt sich ein Abfall des pH-Wertes innerhalb des ersten Monats erkennen, welcher bei der Zellkultur „Telos“ stärker ausfällt als bei der Zellkultur „nur Zellen“. Am 18. Mediumwechsel erreicht der pH-Wert beider Kulturen ein Minimum, mit anschließend leicht ansteigenden Werten bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes.

Der Abfall des pH-Wertes im Medium korreliert mit der lichtmikroskopisch wahrgenommenen Anzahl der im Well wachsenden Zellen und deren Differenzierungsgeschwindigkeit.

Die Entwicklung des pH-Wertes der einzelnen Kulturen relativ zum am Mediumwechsel bestimmten pH-Wert der mitlaufenden „nur Medium“ Proben ist in Abb. 13 aus Gründen der Anschaulichkeit separat dargestellt.

pH - Werte		pH - Werte im Mediumüberstand am jeweiligen Mediumwechsel						
		1	2	3	4	5	6	7
nur Medium	Mittelwert	7,71	7,66	7,63	7,67	7,62	7,62	7,63
	Standardabw.	0,13	0,13	0,03	0,02	0,04	0,02	0,06
nur Zellen	Mittelwert	7,75	7,68	7,60	7,63	7,59	7,57	7,57
	Standardabw.	0,15	0,17	0,03	0,04	0,02	0,04	0,05
Telos	Mittelwert	7,62	7,61	7,65	7,70	7,67	7,61	7,54
	Standardabw.	0,01	0,03	0,01	0,02	0,03	0,02	0,03
autolog	Mittelwert	7,22	7,08	7,06	7,11	7,08	7,07	7,12
	Standardabw.	0,13	0,13	0,04	0,05	0,04	0,03	0,05
		8	9	10	11	12	13	14
nur Medium	Mittelwert	7,67	7,63	7,65	7,64	7,64	7,61	7,61
	Standardabw.	0,07	0,03	0,03	0,03	0,03	0,02	0,02
nur Zellen	Mittelwert	7,59	7,55	7,55	7,53	7,54	7,50	7,51
	Standardabw.	0,06	0,04	0,04	0,03	0,04	0,03	0,01
Telos	Mittelwert	7,53	7,55	7,51	7,39	7,37	7,35	7,29
	Standardabw.	0,05	0,05	0,07	0,06	0,06	0,06	0,05
autolog	Mittelwert	7,16	7,11	7,13	7,11	7,13	7,08	7,10
	Standardabw.	0,06	0,04	0,03	0,05	0,04	0,06	0,05
		18	22	26	30	34	38	42
nur Medium	Mittelwert	7,59	7,59	7,60	7,59	7,59	7,64	7,61
	Standardabw.	0,02	0,03	0,06	0,06	0,05	0,12	0,04
nur Zellen	Mittelwert	7,48	7,48	7,49	7,51	7,53	7,58	7,55
	Standardabw.	0,02	0,02	0,05	0,03	0,04	0,13	0,05
Telos	Mittelwert	7,24	7,21	7,25	7,25	7,27	7,25	7,26
	Standardabw.	0,04	0,03	0,04	0,03	0,02	0,02	0,03
autolog	Mittelwert	7,05	7,03	7,01	7,02	7,04	7,09	7,05
	Standardabw.	0,05	0,04	0,06	0,06	0,07	0,11	0,07

Tab. 2: pH-Werte im Mediumüberstand.

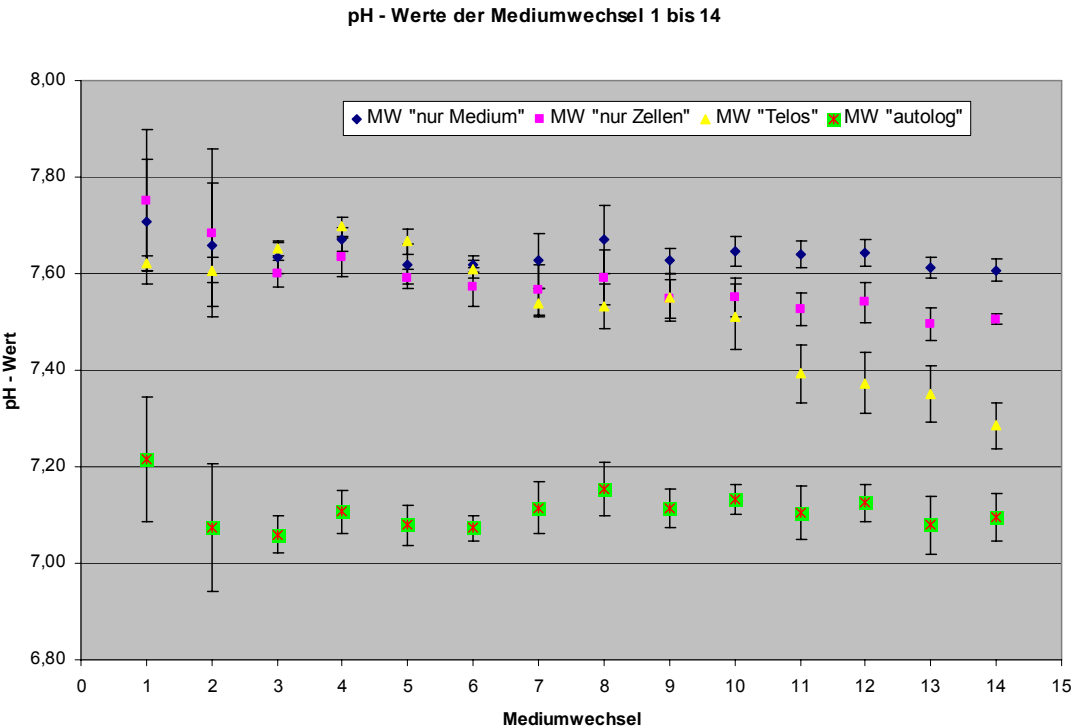


Abb. 9: pH-Werte des Langzeitversuchs der Mediumwechsel 1 bis 14.

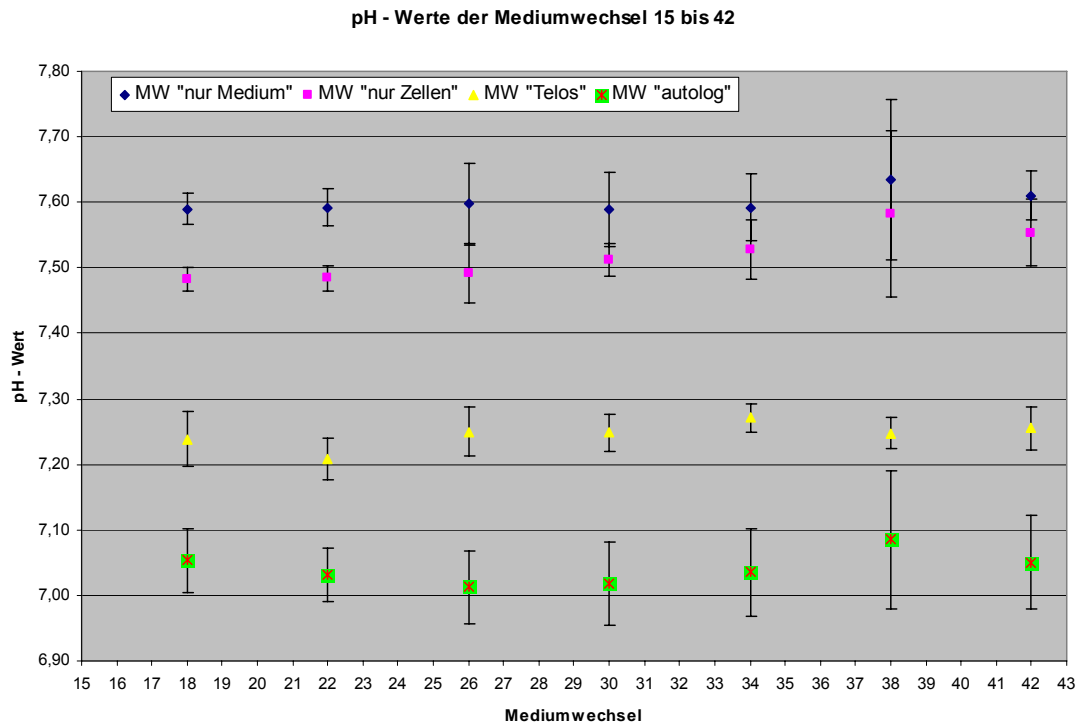


Abb. 10: pH-Werte des Langzeitversuchs der Mediumwechsel 15 bis 42.

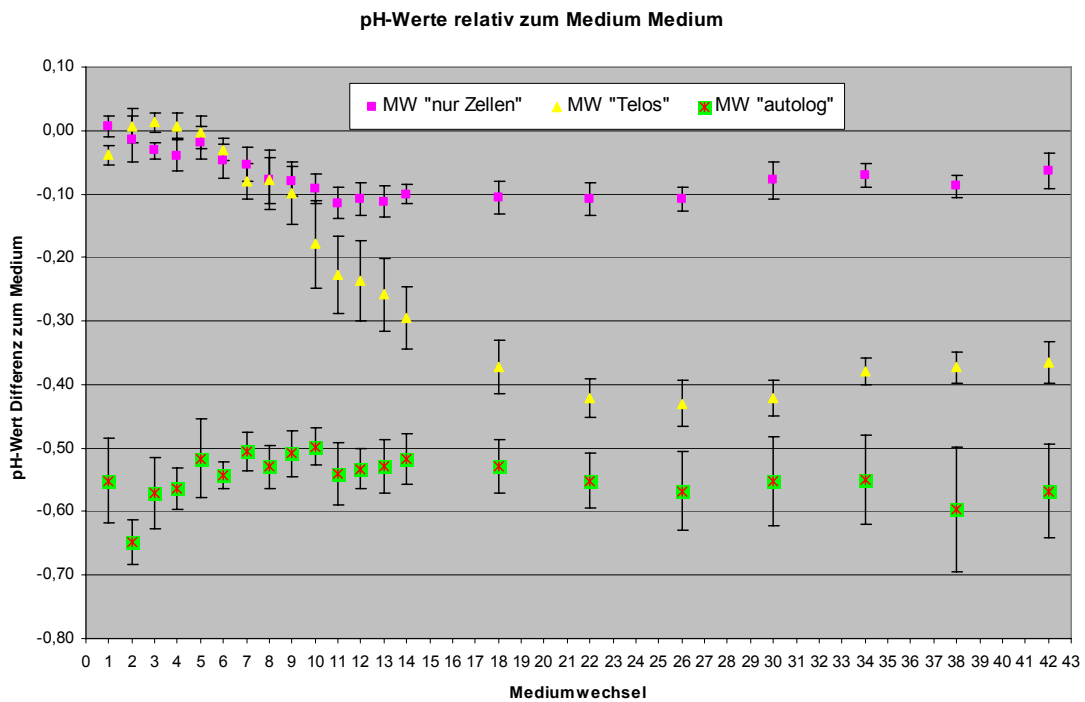


Abb. 11: pH-Werte des Langzeitversuchs relativ zum Medium aufgetragen

III.4 Zellzahlbestimmung über 12 Wochen

III.4.1 Trypanfärbung nach 12 Wochen Zellkultur

Im Rahmen einer Trypanfärbung im Anschluss an eine Knochenmarkspräparation (entspricht Tag 0) konnte gezeigt werden, dass 92,3 % der vorhandenen Zellen vital waren.

Nach einer Zellkulturdauer von 12 Wochen ergab sich folgende Verteilung:

"nur Zellen":		"Telos":		"autolog":	
Patient Telos	81,00%	Patient I	74,20%	Patient V	48,30%
Patient V	82,10%	Patient II	64,90%	Patient VI	64,40%
Patient VII	88,30%	Patient III	71,60%	Patient VII	68,00%
Patient VIII	85,80%	Patient IV	71,70%	Patient VII	64,40%
Mittelwert	84,30%	Mittelwert	70,60%	Patient VIII	68,00%
				Mittelwert	62,62%

Tab. 3: Ergebnisse der Trypanfärbung nach 12 Wochen Zellkultur (Auszählung in einer Neubauer Zählkammer).

Es zeigt sich, dass in Wells, in denen nur Zellen gezüchtet wurden, im Vergleich zu Wells mit Knochenproben am meisten Zellen vital waren.

Des weiteren sind die Werte von „Telos“ und „autolog“ relativ zur gewonnenen Zellzahl zu verstehen, da eine vollständige Lösung der Zellen aus dem Trabekelwerk der eingesetzten Knochenkörper nach 12-wöchiger Kulturdauer nicht mehr möglich war.

III.4.2 Zellzahlbestimmung im abgenommenen Medium

Während der 12-wöchigen Zellkultur wurden die Zellzahlen nach jedem Mediumwechsel im abgenommenen Medium mit Hilfe des Casy-Systems ermittelt (Mediumwechsel 1 – 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38 und 42). Die Counts entsprechen bei den Werten für „nur Zellen“ dem Mittelwert aus fünf erhobenen Messungen, bei „Telos“ und „autologen“ Werten wurde der Mittelwert aus jeweils acht Experimenten ermittelt.

Der jeweilige Mittelwert gibt die Gesamtzahl der abgenommenen Zellen wieder und bezieht sich somit auf 3 ml.

Zellen größer 6,25 µm werden als vital, Zellen kleiner 6,25 µm als tot gewertet. Es folgt eine Übersicht über die insgesamt abgenommenen Zellzahlen gegliedert nach Mediumwechsel und Verfahren. Diese Gesamtzahl wird im Weiteren in die oben angeführten Größen differenziert und separat dargestellt.

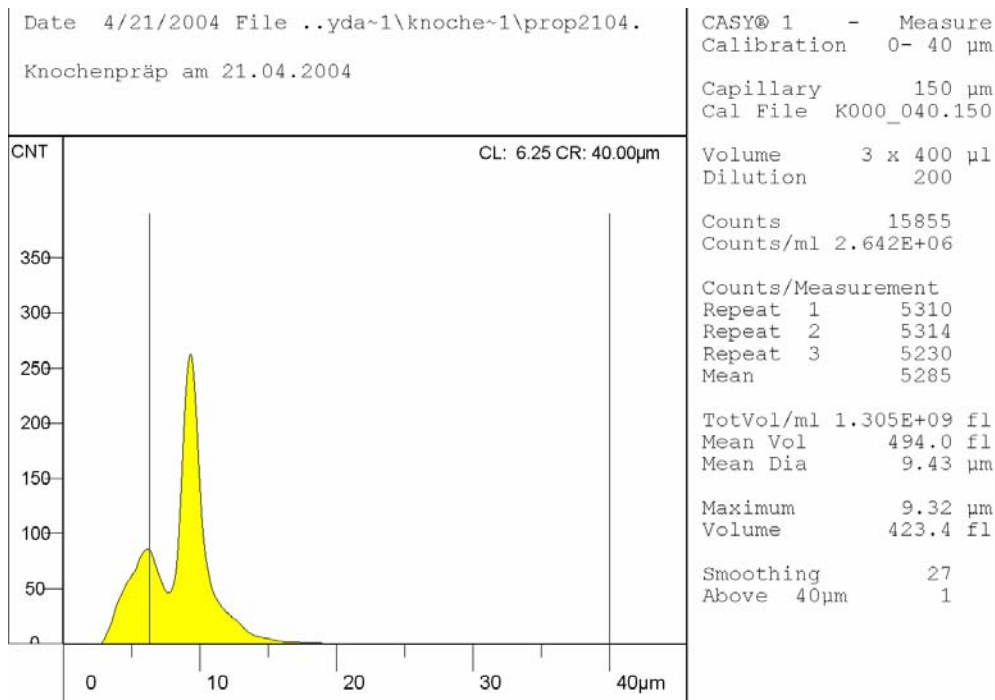


Abb. 12: Zellzahl am Tag der Knochenmarkspräparation. Deutlich zu erkennen ist der Übergang von avitalen zu vitalen Zellen. Die angegebene Counts/ ml müssen auf 50 ml IMDM Medium bezogen werden. Diese Knochenmarkspräparation ergab eine Gesamtzellzahl von 132 Mio. Zellen.

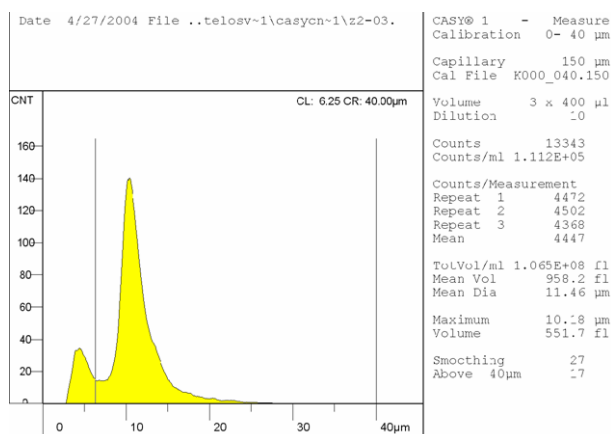
Nur Zellen“:

Abb. 13: Zellzahl bei der Kontrollkultur am 3. Mediumwechsel. Zu erkennen ist, dass der Anteil an vitalen Zellen erheblich größer ist als der Anteil avitaler Zellen.

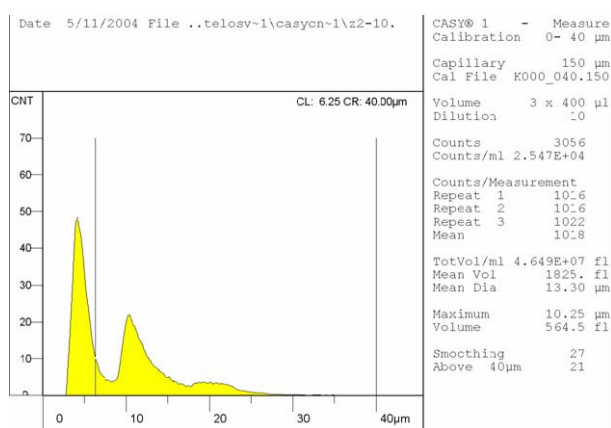


Abb. 14: Zellzahl bei der Kontrollkultur am 10. Mediumwechsel. Zu erkennen ist sowohl eine Vergrößerung des Anteils avitaler Zellen, als auch der Zellen die größer circa 17 µm sind. Es wurden 15.470 Zellen mit dem Medium abgenommen.

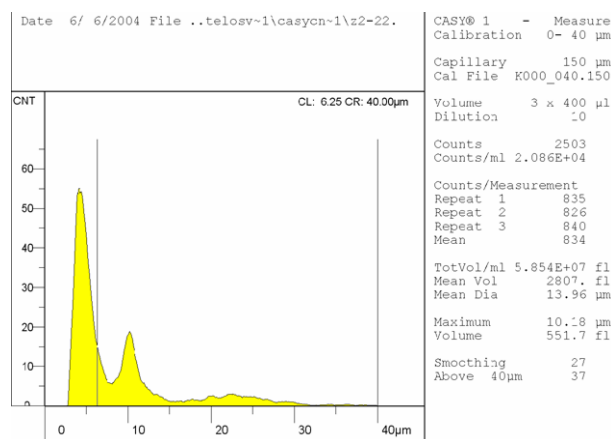


Abb. 15: Zellzahl bei der Kontrollkultur am 22. Mediumwechsel. Es ist eine weitere Zunahme der avitalen Zellen im Medium zu erkennen. Insgesamt wurden bei diesem Mediumwechsel 20.860 Zellen mit abgesaugt.

Es zeigt sich eine kontinuierliche Zunahme avitaler Zellen (< 6,25 µm) im Vergleich zu vitalen Zellen (> 6,25 µm) im Mediumüberstand der Kontrollkultur.

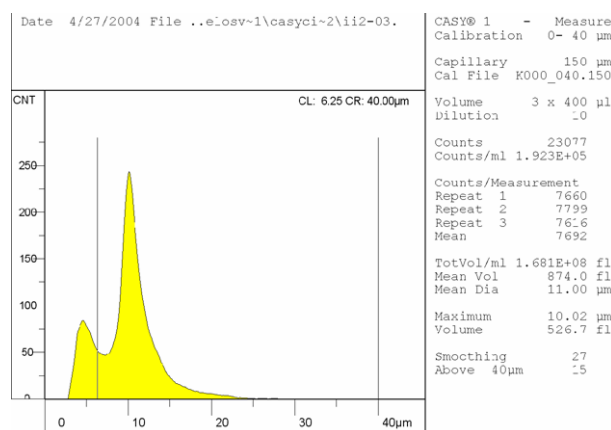
„Telos“:

Abb. 16: Zellzahl bei der Zellkultur „Telos“ am 3. Mediumwechsel. Auch hier ist der Anteil an vitalen Zellen erheblich größer als der Anteil avitaler Zellen.

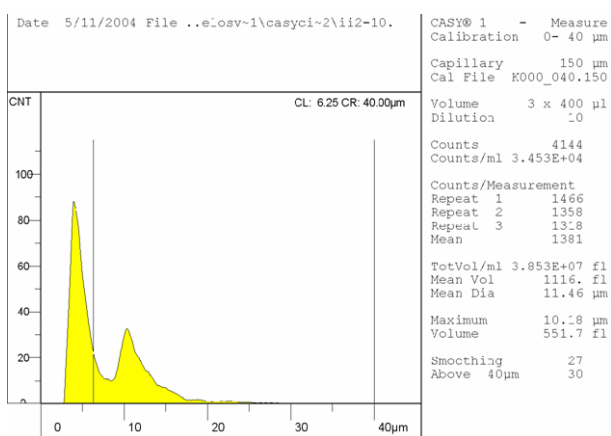


Abb. 17: Zellzahl bei der Zellkultur „Telos“ am 10. Mediumwechsel. Es lässt sich eine Zunahme des Anteils avitaler Zellen erkennen.

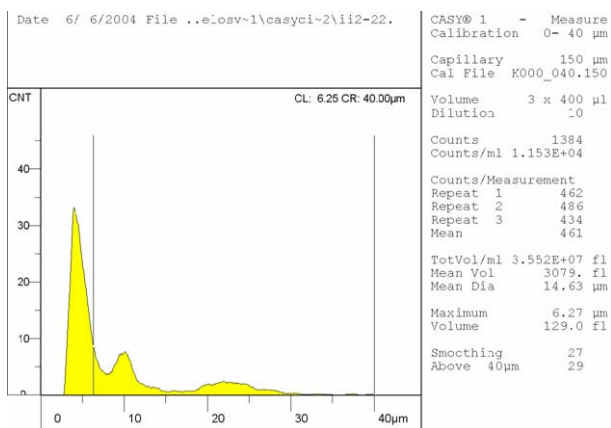


Abb. 18: Zellzahl bei der Zellkultur „Telos“ am 22. Mediumwechsel.

Im Verlauf der Zellkultur „Telos“ lässt sich eine Zunahme der avitalen Zellen im Mediumüberstand feststellen. Der Peak zwischen 17 µm und 30 µm ist hier in Abb. 20 zu sehen.

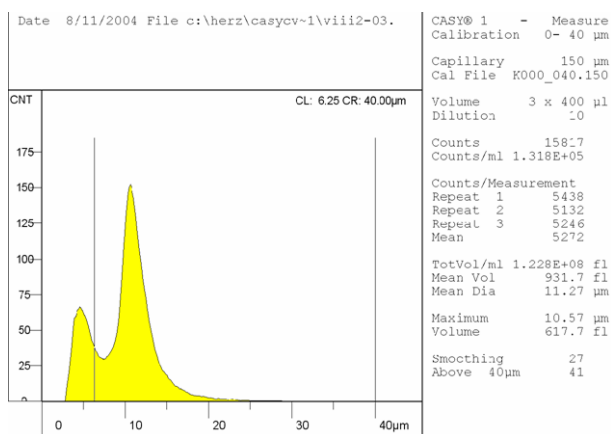
„Autolog“:

Abb. 19: Zellzahl bei der autologen Zellkultur am 3. Mediumwechsel. Der Anteil an vitalen Zellen ist deutlich größer als der Anteil avitaler Zellen.

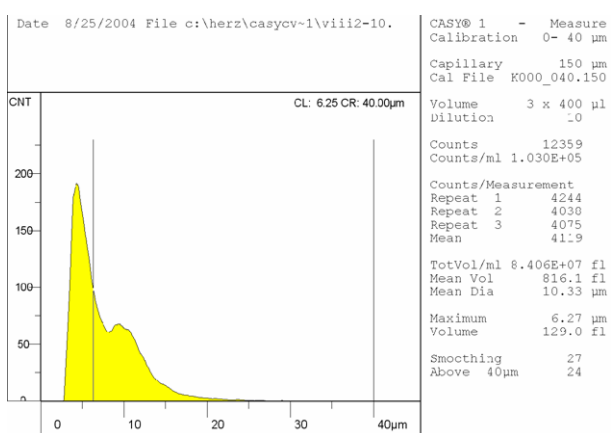


Abb. 20: Zellzahl bei der autologen Zellkultur am 10. Mediumwechsel. Es lässt sich eine Zunahme des Anteils avitaler Zellen erkennen. Des Weiteren ist die Trennung zwischen vitalen und avitalen Zellen nicht so deutlich wie bei den anderen Kulturen.

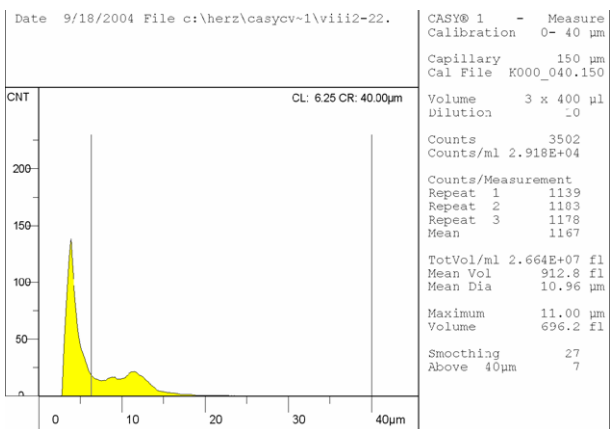


Abb. 21: Zellzahl bei der autologen Zellkultur am 22. Mediumwechsel. Es sind überwiegend avitale Zellen bzw. Zellfragmente im Mediumüberstand zu finden.

Es zeigt sich eine schnelle und ausgeprägte Zunahme der avitalen Zellen im Mediumüberstand der autologen Zellkultur. Der Peak vitaler Zellen schwindet fast vollständig, ein dritter Peak zwischen 17 und 30 µm lässt sich bei der autologen Kultur nicht beobachten.

Zellzahlen gesamt		Zellzahlen im Mediumüberstand am jeweiligen Mediumwechsel						
		1	2	3	4	5	6	7
nur Zellen	Mittelwert	244217	136297	101466	74579	82650	77578	70314
	Standardabw.	195679,8	119768,7	61004,6	58633,0	53634,2	60006,6	54276,0
Telos	Mittelwert	353017	306570	224233	82954	75583	114321	87331
	Standardabw.	50352,4	70111,3	56855,0	22702,9	28988,5	105822,7	54824,3
autolog	Mittelwert	184698	194516	176823	117394	172062	143860	132365
	Standardabw.	89243,9	78549,7	48041,3	58675,1	93125,3	67229,3	45704,9

		8	9	10	11	12	13	14
nur Zellen	Mittelwert	105729	75945	42266	55639	47455	62947	52514
	Standardabw.	101619,4	37070,1	24144,1	36691,5	23800,7	34668,5	18152,0
Telos	Mittelwert	90990	66124	78212	67928	63788	67184	63986
	Standardabw.	35665,3	26051,2	25497,9	17844,1	17172,1	27651,5	17819,0
autolog	Mittelwert	157285	116889	183435	135491	159336	168727	110889
	Standardabw.	84329,2	49320,8	95793,7	122945,7	70983,8	87152,0	48717,1

		18	22	26	30	34	38	42
nur Zellen	Mittelwert	41449	28673	22988	20597	15145	14015	21260
	Standardabw.	39126,5	17687,4	7076,1	7016,8	10492,6	10222,5	27204,0
Telos	Mittelwert	42178	28883	26865	21243	7564	19265	131
	Standardabw.	19313,1	11807,2	6611,4	14757,4	4993,6	9462,6	8643,5
autolog	Mittelwert	39595	18669	12401	23936	8605	13870	15295
	Standardabw.	33026,6	23127,4	3535,1	18412,6	6117,4	9997,4	11619,6

Tab. 4: Gesamtzellzahl im abgenommenen Mediumüberstand (3 ml) (Im Verlauf der 12-wöchigen Zellkultur).

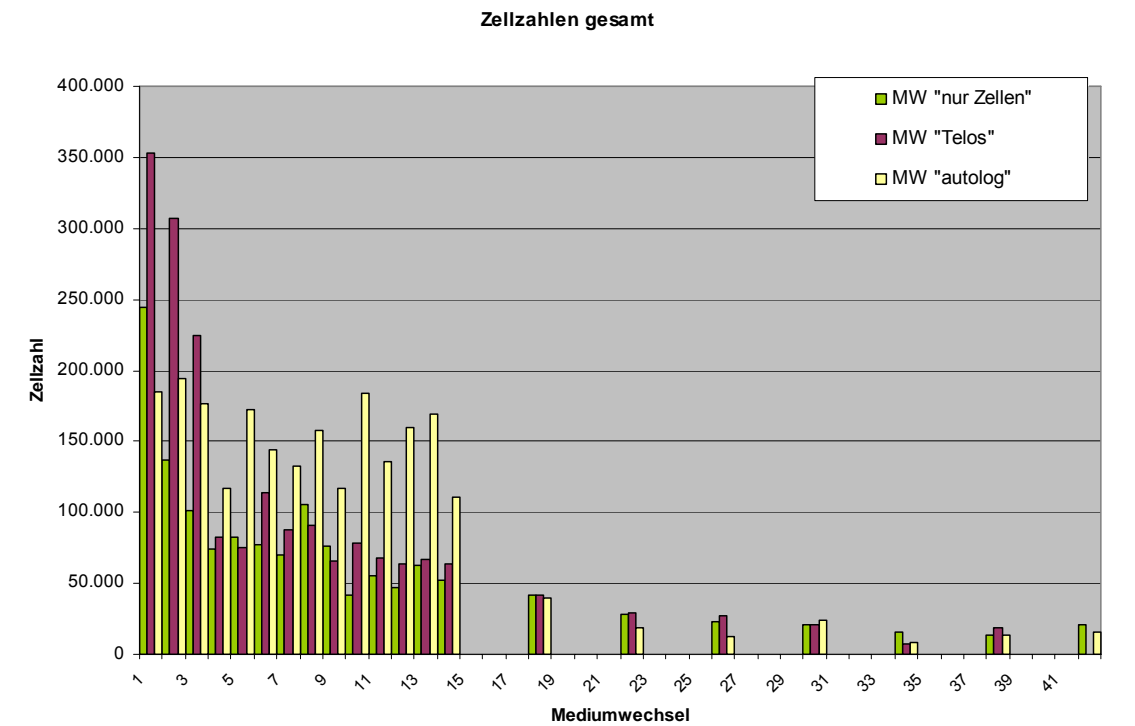


Abb. 22: Gesamtzahl abgenommenen Zellen im Mediumüberstand (3 ml) (während der 12-wöchigen Zellkultur, getrennt nach Verfahren).

Zellzahlen > 6,25 µm		Zellzahlen im Mediumüberstand am jeweiligen Mediumwechsel						
		1	2	3	4	5	6	7
nur Zellen	Mittelwert	204809	128073	89678	67386	68211	65827	59255
	Standardabw.	177083,1	112819,6	60466,7	49440,9	50089,0	58017,1	55030,4
Telos	Mittelwert	260958	258705	191301	63742	55746	78354	62221
	Standardabw.	34484,8	74152,0	61097,4	22680,9	23777,7	93726,9	40238,7
autolog	Mittelwert	145636	153396	129019	77634	114756	82302	70620
	Standardabw.	75053,6	73135,8	38639,0	53181,8	76056,9	50214,3	21139,2

		8	9	10	11	12	13	14
nur Zellen	Mittelwert	88471	60431	31450	38362	35553	41427	30467
	Standardabw.	90455,1	34803,1	24823,0	34776,1	14527,3	28651,6	13221,8
Telos	Mittelwert	58316	33468	43476	39967	38042	35940	31249
	Standardabw.	24268,4	10913,6	20028,6	12698,8	14989,6	16852,2	10603,2
autolog	Mittelwert	71539	62023	53350	50437	52192	39416	41813
	Standardabw.	53785,9	31261,8	28638,3	42167,7	39433,4	26108,7	21992,9

		18	22	26	30	34	38	42
nur Zellen	Mittelwert	28966	19887	13066	9990	8292	7207	12608
	Standardabw.	26658,2	14643,8	7170,0	4297,9	6417,6	5734,2	17393,1
Telos	Mittelwert	20796	16161	12973	12450	3497	7010	6529
	Standardabw.	10579,4	6866,8	5772,8	9262,5	2029,5	3502,8	2986,0
autolog	Mittelwert	19065	8808	5943	3232	4025	2439	3043
	Standardabw.	13959,2	9750,1	2392,9	1136,6	3025,2	4178,8	4362,0

Tab. 5: Anzahl der Zellen im Mediumüberstand (3 ml) >6,25 µm = vital (im Verlauf der 12-wöchigen Zellkultur).

Zellzahlen < 6,25 µm		Zellzahlen im Mediumüberstand am jeweiligen Mediumwechsel						
		1	2	3	4	5	6	7
nur Zellen	Mittelwert	39424	8205	11814	7203	14366	11756	11059
	Standardabw.	29397,6	7300,9	4788,9	9823,6	5391,4	6354,9	2051,6
Telos	Mittelwert	92054	47875	35646	19209	19520	12100	25106
	Standardabw.	20894,8	22455,6	8154,5	6002,1	7047,0	7505,9	18891,0
autolog	Mittelwert	39057	41146	47813	39763	57304	74065	61744
	Standardabw.	17161,8	15619,4	18983,7	20207,3	25528,1	46117,9	26632,4

		8	9	10	11	12	13	14
nur Zellen	Mittelwert	17249	15560	10810	17272	11899	21511	22045
	Standardabw.	12611,8	6866,3	3677,5	5577,3	9945,3	9339,4	7357,9
Telos	Mittelwert	32675	32665	34741	27961	25755	31242	32739
	Standardabw.	14890,9	21324,6	7719,6	6495,3	5400,0	11802,2	13246,5
autolog	Mittelwert	85714	54855	76360	85056	107148	129318	69077
	Standardabw.	47541,5	22095,8	71721,1	82563,8	63052,8	80939,0	34638,8

		18	22	26	30	34	38	42
nur Zellen	Mittelwert	12492	8787	14455	11645	8666	9101	12123
	Standardabw.	13360,9	4987,7	5954,6	2924,6	6642,8	6220,3	19698,0
Telos	Mittelwert	21384	12725	13893	8792	4066	12251	16913
	Standardabw.	10078,3	6405,3	2882,0	6232,6	3769,7	6175,6	6793,0
autolog	Mittelwert	20526	9859	6861	8291	4365	5461	5066
	Standardabw.	23928,8	13995,2	2388,5	6411,6	3959,3	7823,9	7596,4

Tab. 6: Anzahl der Zellen im Mediumüberstand (3 ml) <6,25 µm = avital (im Verlauf der 12-wöchigen Zellkultur).

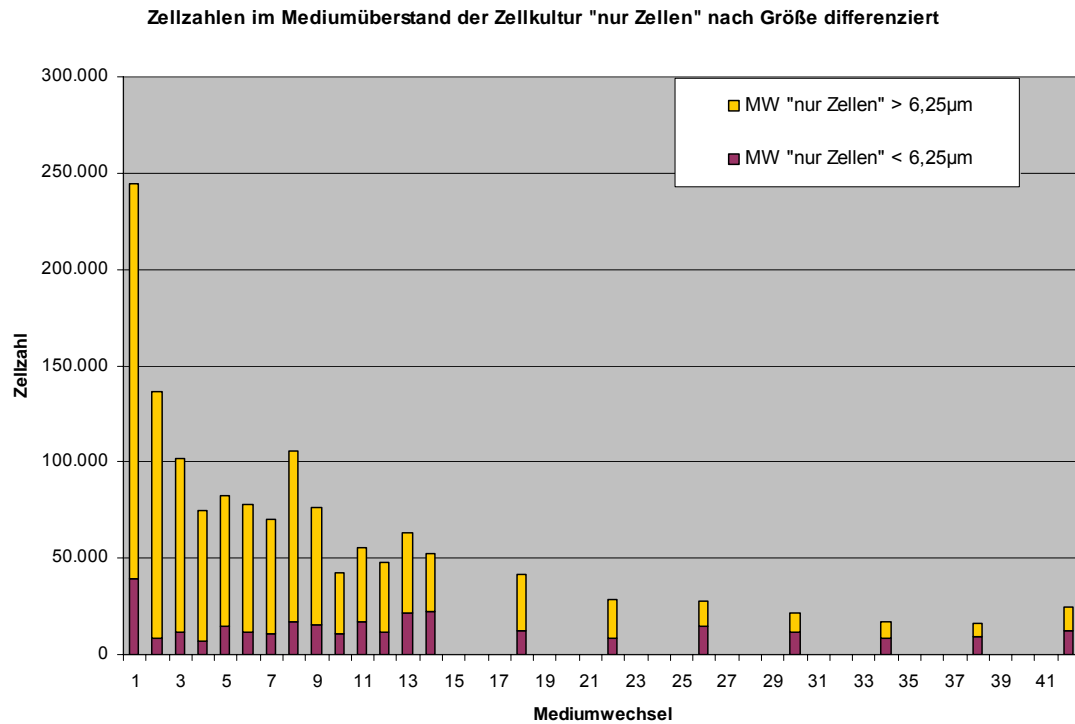


Abb. 23: Zellzahlen im Mediumüberstand der Kontrollkultur „nur Zellen“ (unterteilt in Zellen $< 6,25 \mu\text{m}$ = avital und $> 6,25 \mu\text{m}$ = vital).

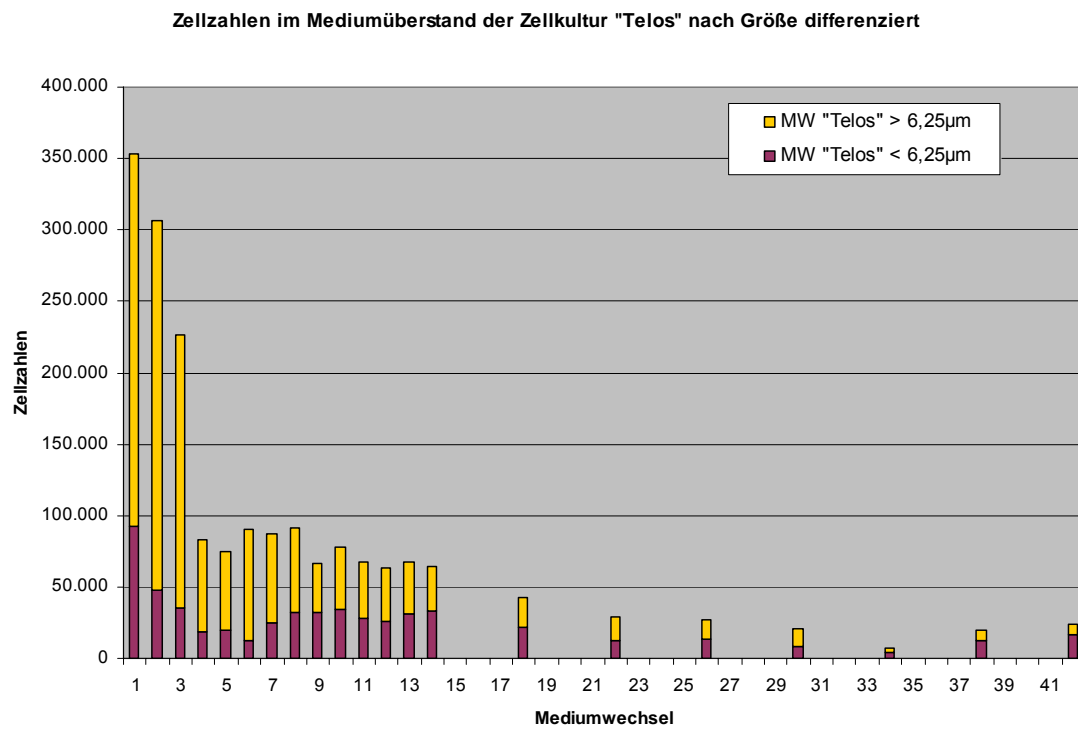


Abb. 24: Zellzahlen im Mediumüberstand der Zellkultur „Telos“ (unterteilt in Zellen $< 6,25 \mu\text{m}$ = avital und $> 6,25 \mu\text{m}$ = vital).

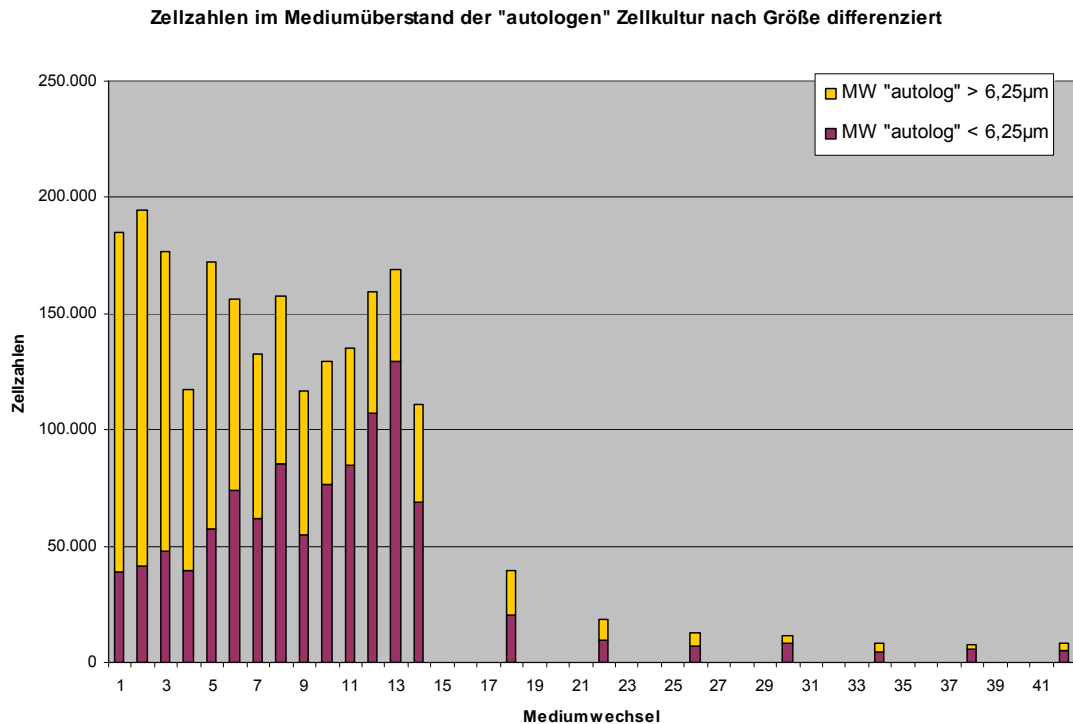


Abb. 25: Zellzahlen im Mediumüberstand der Zellkultur „autolog“ (unterteilt in Zellen <6,25 µm = avital und >6,25 µm = vital).

Bei diesen Messungen der Zellzahl im abgenommen Mediumüberstand zeigt sich, dass bei der Kontrollkultur „nur Zellen“ nach anfänglich sehr hohen Mengen abgesaugter Zellen (1. Mediumwechsel: 244.217) diese über den restlichen Verlauf der Zellkultur rückläufig ist (42. Mediumwechsel: 21.260). Die Anzahl der Zellen kleiner 6,25 µm, also der avitalen Zellen, bleibt, mit Ausnahme des ersten Mediumwechsels, während der gesamten Zeit kontinuierlich zwischen circa 10.000 und circa 20.000.

Bei der Zellkultur „Telos“ wurden während der ersten 14 Mediumwechsel mehr Zellen abgesaugt als bei späteren Mediumwechseln, es zeigen sich die höchsten Werte bei den ersten drei Mediumwechseln. Die abgesaugten avitalen Zellen zeigen ein absolutes Maximum beim ersten Mediumwechsel (92.054), wonach sie stets unter 50.000 pro Mediumwechsel liegen.

Die Zahlen der abgesaugten Zellen bei Mediumwechseln der Kultur „autolog“ sind nach den ersten Mediumwechseln nicht rückläufig, auch steigt die Zahl der Zellen kleiner 6,25 µm ab dem ersten Mediumwechsel (39.057 Zellen) bis zum 13. Mediumwechsel (129.318 Zellen) stetig an. Ab dem 18. Mediumwechsel fallen die Zahlen der abgesaugten Zellen insgesamt stark ab

III.5 Enzymbestimmung der Zellkultur

Die Werte von Lactat, Alkalischer Phosphatase und Lactatdehydrogenase wurden jeweils aus dem Mediumüberstand eines Wells (3 ml) ermittelt. In den nachfolgenden Tabellen und Diagrammen werden Mittelwerte verwendet, die sich im Falle der Werte für „nur Zellen“ aus sieben Einzelwerten, bei „Telos“ und „autolog“ aus acht Einzelwerten ergaben (jeder Einzelwert wurde durch eine Doppelbestimmung erhoben). Des Weiteren wird in Tabelle und Graph die Standardabweichung angegeben, die Tabelle gibt zusätzlich unter „T-Test“ den p-Wert für das jeweilige Vergleichspaar wieder.

III.5.1 Lactat

Lactat		Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen						
		1	2	3	4	5	6	7
nur Zellen	MW (mmol / l)	4,59	5,36	5,40	5,52	6,44	7,02	7,60
	Standardabw.	0,749	1,403	1,067	1,284	1,017	1,245	1,102
Telos	MW (mmol / l)	4,00	5,11	5,48	5,71	6,10	6,49	8,72
	Standardabw.	0,109	0,417	0,444	0,550	0,649	1,051	1,788
autolog	MW (mmol / l)	34,98	39,04	34,79	33,77	33,06	33,76	31,81
	Standardabw.	4,785	5,185	2,697	2,389	2,195	2,893	1,692
		8	9	10	11	12	13	14
nur Zellen	MW (mmol / l)	8,87	8,82	9,95	11,01	11,09	11,52	11,69
	Standardabw.	1,516	1,679	1,220	1,602	0,737	1,081	1,128
Telos	MW (mmol / l)	11,56	12,60	16,34	34,30	36,21	36,15	36,73
	Standardabw.	2,476	2,623	3,400	26,640	29,059	28,837	29,303
autolog	MW (mmol / l)	31,73	30,65	31,57	33,96	31,99	32,61	31,90
	Standardabw.	2,811	1,483	2,136	3,934	2,218	3,078	2,835

T - Test							
	1	2	3	4	5	6	7
Zellen / Telos	$p \leq 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$
Zellen / autolog	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Telos / autolog	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
	8	9	10	11	12	13	14
Zellen / Telos	$p \leq 0,05$	$p < 0,01$	$p < 0,001$	$p \leq 0,05$	$p \leq 0,05$	$p \leq 0,05$	$p \leq 0,05$
Zellen / autolog	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Telos / autolog	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$

Tab. 7: Lactat-Werte im Verlauf der Mediumwechsel 1 bis 14 (die Mittelwerte der Kontrollkultur „nur Zellen“ sind mit angegeben).

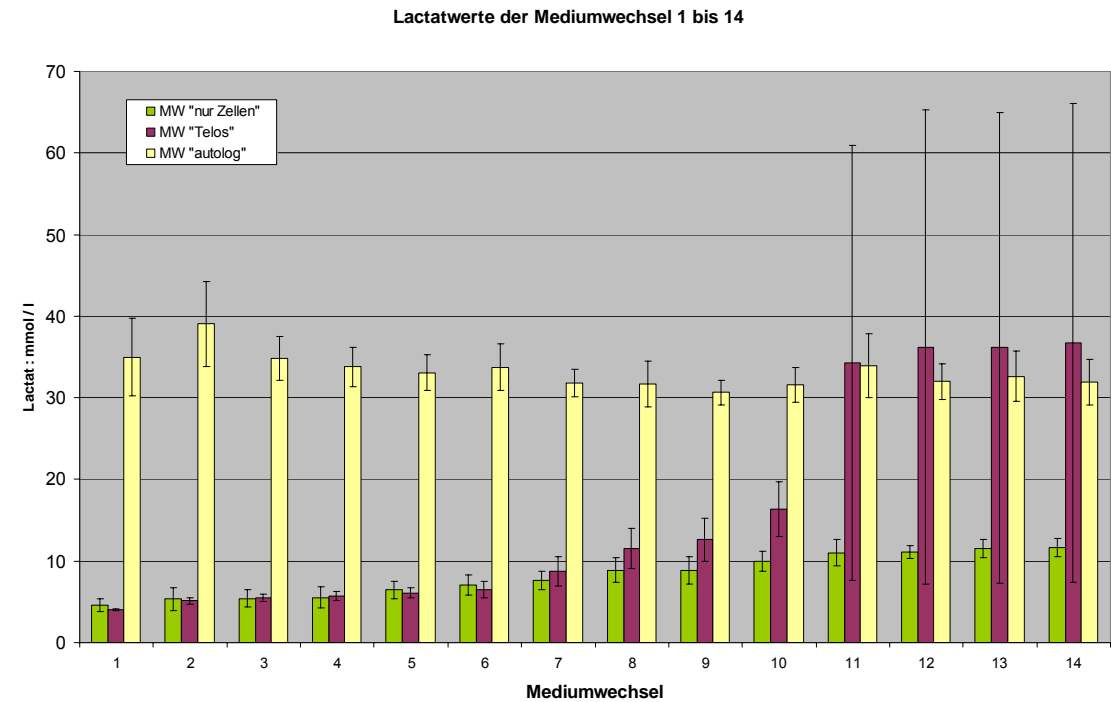


Abb. 26: Lactat-Werte im Verlauf der Mediumwechsel 1 bis 14.

Lactat		Mittelwerte und Standardabweichungen						
		18	22	26	30	34	38	42
nur Zellen	MW (mmol / l)	12,19	11,36	10,08	9,31	9,16	8,60	8,24
	Standardabw.	2,340	2,014	0,822	0,620	0,720	1,384	2,026
Telos	MW (mmol / l)	40,45	39,02	31,54	28,98	29,54	28,64	28,17
	Standardabw.	31,853	30,680	25,158	23,290	23,616	22,278	22,294
autolog	MW (mmol / l)	31,54	32,58	32,37	32,29	31,30	31,96	31,95
	Standardabw.	2,106	2,601	2,760	3,128	2,845	3,684	3,752

		T - Test						
		18	22	26	30	34	38	42
Zellen / Telos	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05
Zellen / autolog	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
Telos / autolog	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05

Tab. 8: Lactat-Werte im Verkauf der Mediumwechsel 15 bis 42 (zusätzlich aufgeführt sind die p-Werte des Studentschen T-Tests).

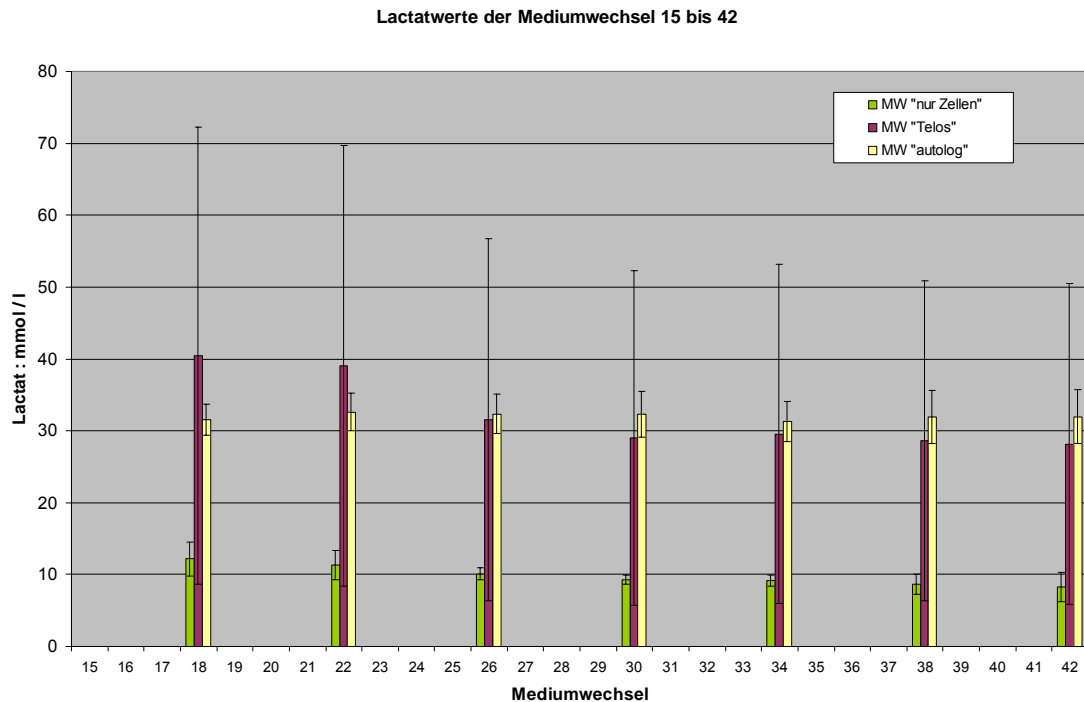


Abb. 27: Lactat-Werte im Verlauf der Mediumwechsel 15 bis 42.

Es zeigt sich, dass bei „nur Zellen“ die Lactat-Werte nach einem Minimum am ersten Mediumwechsel (4,6 mmol/ l) zuerst bis zu einem Maximum am 18. Mediumwechsel (12,2 mmol/ l) ansteigen und im Anschluss wieder leicht abfallen.

Die Lactat-Werte bei „Telos“ steigen ebenfalls von einem Minimum am ersten Mediumwechsel (4,0 mmol/ l) zu einem Maximum am 18. Mediumwechsel (40,5 mmol/ l) an, jedoch in weit größerem Maße. So kann ab dem 8. Mediumwechsel ein signifikant höherer Anstieg als bei der Kontrollkultur aufgezeigt werden.

Bei der autologen Zellkultur lässt sich ein Maximum schon am 2. Mediumwechsel (39,0 mmol/ l) beobachten, woraufhin die Werte zwar abfallen, jedoch nie unter 30 mmol/ l. Zu den Werten der Kontrollkultur besteht stets ein hochsignifikanter Unterschied, zu den Werten der „Telos“-Zellkultur besteht bis einschließlich zum 10. Mediumwechsel ein hochsignifikanter Unterschied, anschließend ist kein signifikanter Unterschied der Werte mehr gegeben.

Der Anstieg der Lactat-Werte bei der „Telos“-Kultur korreliert hierbei mit einer pH-Wert-Abnahme im Medium. Und auch die stets hohen Lactat-Werte der „autologen“ Kultur passen zu den immer sehr niedrigen pH-Werten, die im entsprechenden Medium nachgewiesen wurden.

III.5.2 Lactatdehydrogenase (LDH)

Lactatdehydrogenase (LDH)		Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen						
		1	2	3	4	5	6	7
nur Zellen	MW (U / l)	36,57	31,86	31,29	31,14	35,43	30,71	31,29
	Standardabw.	2,699	3,132	3,861	6,256	3,457	4,680	4,499
Telos	MW (U / l)	32,25	32,88	34,25	36,50	38,50	42,38	47,25
	Standardabw.	4,200	2,997	2,315	2,673	1,195	3,378	2,375
autolog	MW (U / l)	604,50	456,88	259,00	175,50	144,25	130,00	118,63
	Standardabw.	189,806	192,213	119,199	74,264	54,620	41,349	28,844
		8	9	10	11	12	13	14
nur Zellen	MW (U / l)	34,29	35,14	37,71	41,43	39,14	43,29	42,71
	Standardabw.	3,039	3,716	5,823	8,696	3,288	6,020	5,678
Telos	MW (U / l)	50,63	52,25	60,38	67,00	73,13	76,63	81,88
	Standardabw.	3,777	4,400	7,558	8,018	6,357	5,208	4,824
autolog	MW (U / l)	113,50	107,50	104,38	111,00	95,88	95,63	88,63
	Standardabw.	23,232	11,058	12,950	12,581	11,370	4,689	4,470

		T - Test						
		1	2	3	4	5	6	7
Zellen / Telos		p ≤ 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p < 0,001	p < 0,001
Zellen / autolog		p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
Telos / autolog		p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
		8	9	10	11	12	13	14
Zellen / Telos		p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
Zellen / autolog		p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
Telos / autolog		p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p ≤ 0,05

Tab. 9: LDH-Werte im Verlauf der Mediumwechsel 1 bis 14 (die Mittelwerte der Kontrollkultur „nur Zellen“ sind mit angegeben).

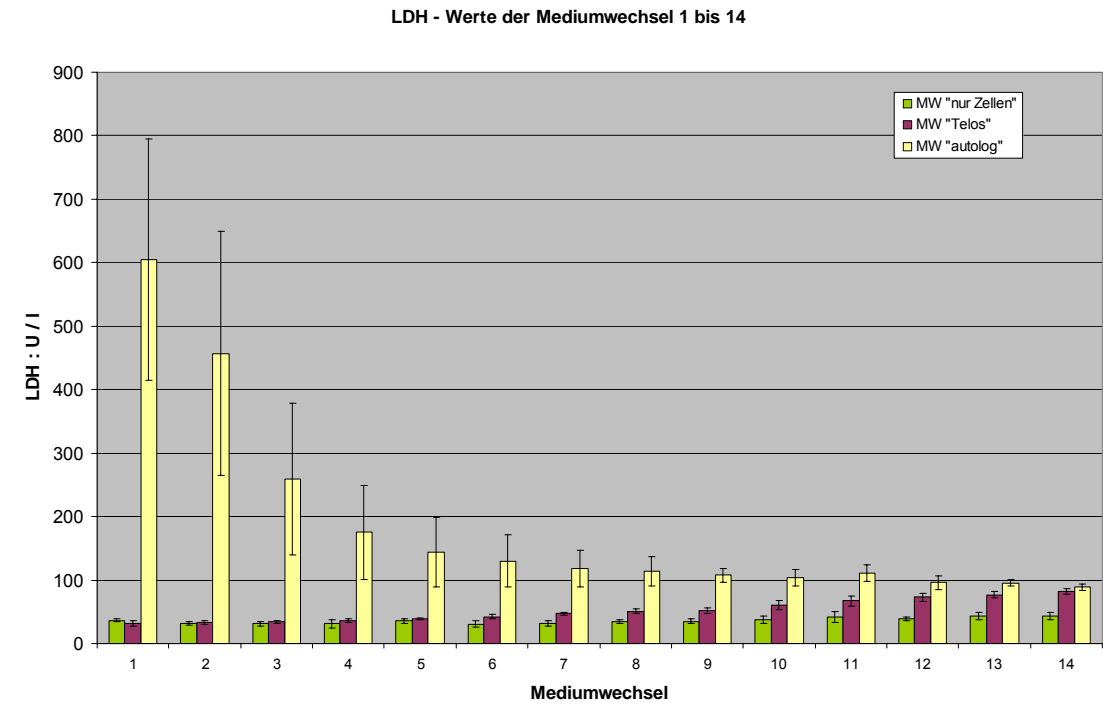


Abb. 28: LDH-Werte im Verlauf der Mediumwechsel 1 bis 14.

Lactatdehydrogenase (LDH)		Mittelwerte und Standardabweichungen						
		18	22	26	30	34	38	42
nur Zellen	MW (U / l)	46,14	43,14	41,86	40,71	44,00	42,57	44,43
	Standardabw.	4,562	2,795	6,866	7,931	6,298	6,705	7,277
Telos	MW (U / l)	89,63	81,25	84,38	83,25	85,38	87,50	79,75
	Standardabw.	5,344	4,132	3,292	1,669	5,097	4,309	5,600
autolog	MW (U / l)	79,00	76,63	74,00	71,50	71,13	68,88	67,75
	Standardabw.	4,536	5,780	5,210	7,329	5,540	4,734	3,919

		T - Test						
		18	22	26	30	34	38	42
Zellen / Telos		p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
Zellen / autolog		p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
Telos / autolog		p < 0,001	p > 0,05	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001

Tab. 10: LDH-Werte im Verlauf der Mediumwechsel 15 bis 42 (zusätzlich aufgeführt sind die p-Werte des Studentischen T-Tests).

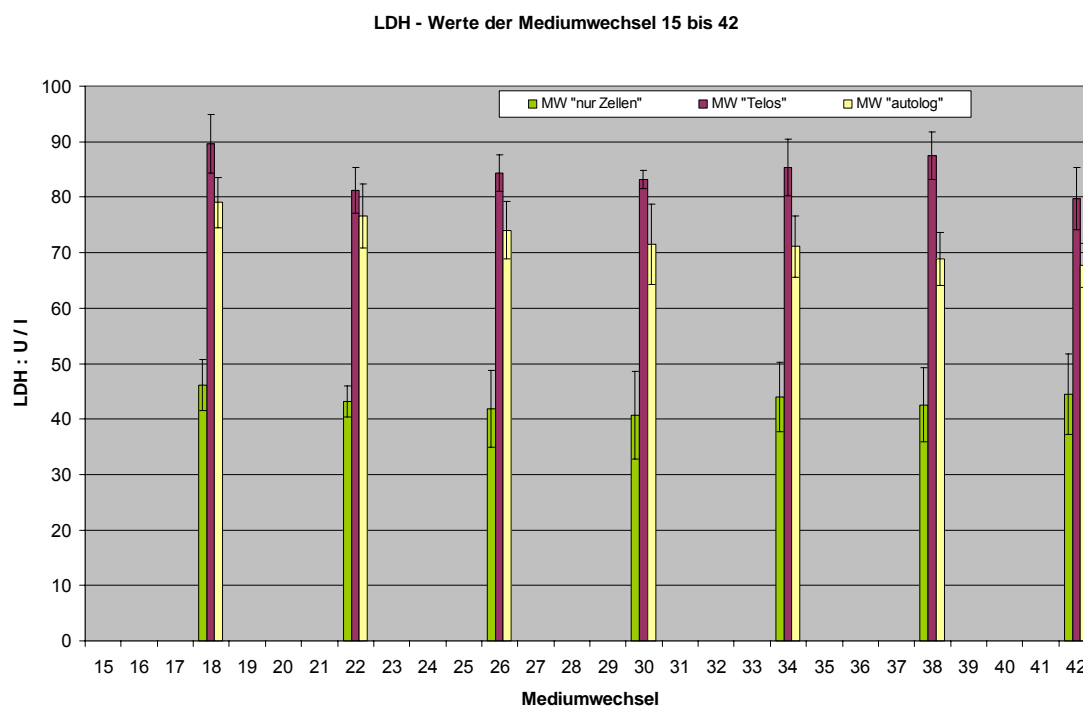


Abb. 29: LDH-Werte im Verlauf der Mediumwechsel 15 bis 42.

Die LDH-Mittelwerte im Mediumüberstand der Kontrollkultur „nur Zellen“ liegen zwischen circa 30 und circa 45 U/ l, womit sie einen recht horizontalen Kurvenverlauf wiedergeben. Anders bei der „Telos“-Kultur, in deren Mediumüberstand die LDH-Werte nach anfänglich niedrigen Werten (32,3 U/ l) auf fast 90 U/ l ansteigen. Die autologe Zellkultur zeigt einen umgekehrten Kurvenverlauf, indem die LDH-Werte von anfänglich über 600 U/ l auf unter 70 U/ l abfallen.

Zwischen den Mittelwerten der Kontrollkultur und der „Telos“-Kultur zeigen sich hierbei ab dem 5. Mediumwechsel signifikante, ab dem 6. Mediumwechsel sogar hochsignifikante Unterschiede.

Die Mittelwerte der Kontrollkultur und des autologen Verfahrens unterscheiden sich stets hochsignifikant, auch zwischen den Werten der autologen und der „Telos“-Zellkultur zeigen sich bis auf wenige Ausnahmen (7. Mediumwechsel: signifikant, 22. Mediumwechsel: keine Signifikanz) hochsignifikante Unterschiede.

III.5.3 Alkalische Phosphatase (AP)

Alkalische Phosphatase (AP)		Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen						
		1	2	3	4	5	6	7
nur Zellen	MW (U / l)	0,86	0,00	0,43	0,29	0,86	1,43	1,29
	Standardabw.	0,378	0,000	0,535	0,488	0,378	1,512	0,756
Telos	MW (U / l)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,50
	Standardabw.	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,463	0,535
autolog	MW (U / l)	279,13	188,13	80,75	32,38	15,88	10,63	7,00
	Standardabw.	152,015	134,217	60,771	21,253	8,374	3,159	2,138
		8	9	10	11	12	13	14
nur Zellen	MW (U / l)	1,29	1,43	1,57	1,00	1,43	1,43	1,43
	Standardabw.	0,756	0,535	0,787	0,816	0,535	0,787	0,535
Telos	MW (U / l)	1,00	1,00	1,38	1,63	1,75	1,38	1,25
	Standardabw.	0,000	0,000	0,518	0,518	0,463	0,518	0,463
autolog	MW (U / l)	5,25	4,50	3,88	2,38	2,88	2,63	2,25
	Standardabw.	1,909	1,309	1,356	1,598	0,991	0,518	0,463

		T - Test						
		1	2	3	4	5	6	7
Zellen / Telos	p < 0,001		p ≤ 0,05	p > 0,05	p < 0,001	p > 0,05	p ≤ 0,05	
Zellen / autolog	p < 0,001	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
Telos / autolog	p < 0,001	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
		8	9	10	11	12	13	14
Zellen / Telos	p > 0,05	p ≤ 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
Zellen / autolog	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,01	p > 0,05	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01
Telos / autolog	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p > 0,05	p ≤ 0,05	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001

Tab. 11: AP-Werte im Verlauf der Mediumwechsel 1 bis 14 (zusätzlich aufgeführt sind die p-Werte des Studentschen T-Tests).

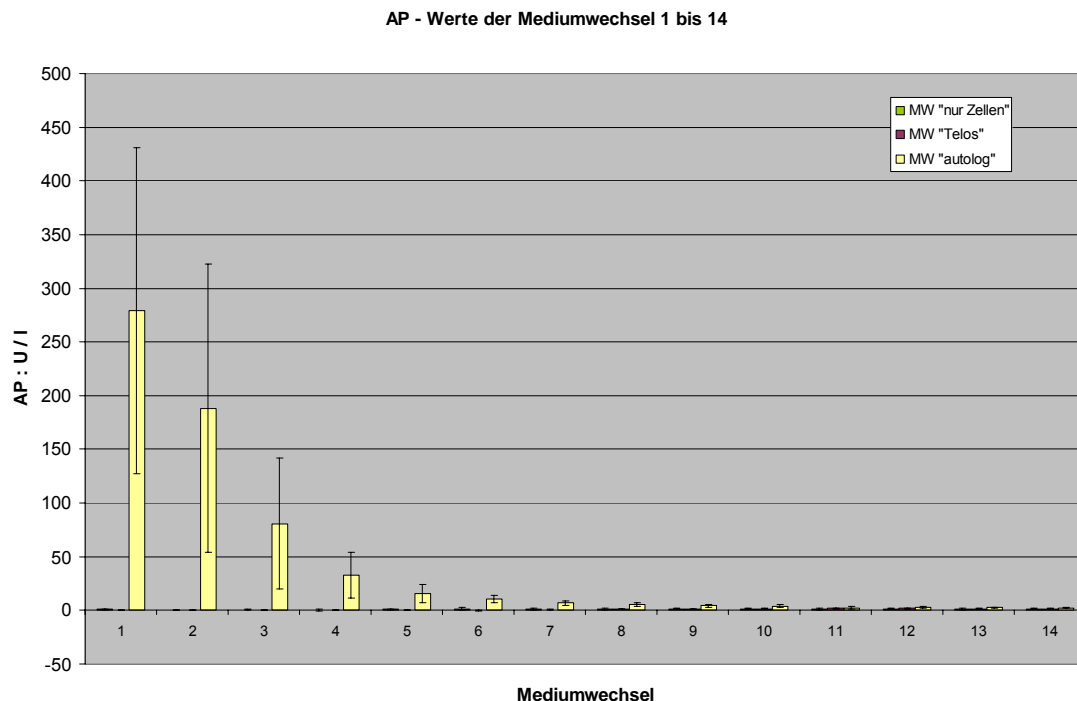


Abb. 30: AP-Werte im Verlauf der Mediumwechsel 1 bis 14.

Alkalische Phosphatase (AP)		Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen						
		18	22	26	30	34	38	42
nur Zellen	MW (U / l)	1,00	0,86	0,43	0,71	0,57	0,57	0,57
	Standardabw.	0,577	0,378	0,535	0,488	0,535	0,535	0,535
Telos	MW (U / l)	1,00	0,50	0,63	0,00	0,25	0,00	0,13
	Standardabw.	0,000	0,535	0,518	0,000	0,463	0,000	0,354
autolog	MW (U / l)	1,88	1,38	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	Standardabw.	0,354	0,518	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

		T - Test						
		18	22	26	30	34	38	42
Zellen / Telos	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p < 0,01	p > 0,05	p < 0,01	p > 0,05	
Zellen / autolog	p < 0,01	p ≤ 0,05	p < 0,01	p > 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	
Telos / autolog	p < 0,001	p < 0,01	p > 0,05		p < 0,001		p < 0,001	

Tab. 12: AP-Werte im Verlauf der Mediumwechsel 15 bis 42 (zusätzlich aufgeführt sind die p-Werte des Studentschen T-Tests).

Die im Mediumüberstand gemessenen Mittelwerte der Alkalischen Phosphatase sind außer bei der „autologen“ Zellkultur stets sehr niedrig bis nicht vorhanden. Im Verlauf der „autologen“ Zellkultur fallen sie von anfänglich fast 280 U/ l auf ebenso niedrige Werte ab.

Dieses zeigt sich auch bei der Berechnung der Signifikanz, so sind die Unterschiede der Mittelwerte zwischen „autologer“ Kultur und der Kontrollkultur bis zum 10. Mediumwechsel stets „sehr signifikant“ oder sogar „hochsignifikant“. Auf Grund der

sehr geringen Werte im weiteren Verlauf der „autologen“ Kultur und über den gesamten Zeitraum der Zellkultur „Telos“ wird auf die betreffenden Signifikanzen nicht näher eingegangen.

III.6 Zytokinprofil der Zellkultur

Die im Folgenden angegebenen Mittelwerte der Zytokine Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6), Tumornekrosefaktor- α (TNF α) und Interferon- γ (IFN γ) wurden im Rahmen einer Doppelbestimmung aus dem Mediumüberstand eines Wells (3 ml) ermittelt und setzen sich bei „nur Zellen“ aus sieben, bei „Telos“ und „autolog“ aus acht dieser Doppelbestimmungen zusammen.

Des Weiteren wird in Tabelle und Graph die Standardabweichung angegeben, die Tabelle gibt zusätzlich unter „T-Test“ den p-Wert für das jeweilige Vergleichspaar wieder.

III.6.1 Interleukin-1β (IL-1β)

Interleukin - 1 beta (IL - 1b)		Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen						
		1	2	3	4	5	6	7
nur Zellen	MW (pg / ml)	151,18	4,65	0,51	8,39	0,09	0,35	1,53
	Standardabw.	161,977	7,949	1,358	18,698	0,242	0,921	4,038
Telos	MW (pg / ml)	156,15	17,28	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Standardabw.	23,378	14,106	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
autolog	MW (pg / ml)	6144,12	2213,15	519,24	130,30	43,50	22,33	13,88
	Standardabw.	5649,979	1794,893	448,034	84,606	19,825	11,267	3,927
		8	9	10	11	12	13	14
nur Zellen	MW (pg / ml)	0,00	0,49	0,09	1,02	7,87	0,00	1,54
	Standardabw.	0,000	1,300	0,240	2,699	12,603	0,000	3,771
Telos	MW (pg / ml)	0,00	2,66	0,78	0,70	3,59	1,91	1,20
	Standardabw.	0,000	3,458	1,959	1,978	4,724	2,959	1,601
autolog	MW (pg / ml)	17,50	23,67	21,20	33,17	33,42	31,68	31,03
	Standardabw.	8,782	17,869	13,839	29,529	28,923	26,810	21,582

		T - Test						
		1	2	3	4	5	6	7
Zellen / Telos		p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
Zellen / autolog		p ≤ 0,05	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
Telos / autolog		p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
		8	9	10	11	12	13	14
Zellen / Telos			p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
Zellen / autolog		p < 0,001	p < 0,01	p < 0,01	p ≤ 0,05	p > 0,05	p < 0,01	p < 0,01
Telos / autolog		p < 0,001	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01	p ≤ 0,05	p < 0,01	p < 0,01

Tab. 13: IL-1β-Werte im Verlauf der Mediumwechsel 1 bis 14 (die Mittelwerte der Kontrollkultur „nur Zellen“ sind mit angegeben).

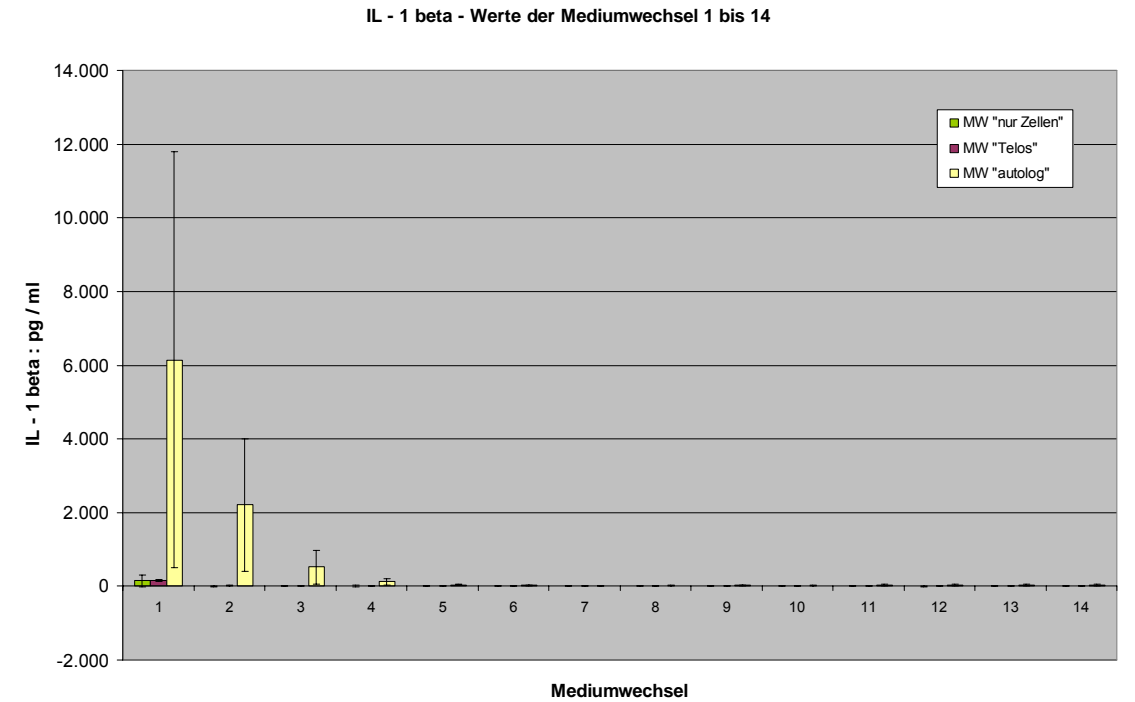


Abb. 31: IL-1β-Werte im Verlauf der Mediumwechsel 1 bis 14.

Interleukin - 1 beta (IL - 1b)		Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen						
		18	22	26	30	34	38	42
nur Zellen	MW (pg / ml)	2,22	6,85	2,88	0,00	1,65	0,00	0,91
	Standardabw.	5,870	14,082	5,963	0,000	3,244	0,000	1,819
Telos	MW (pg / ml)	2,49	2,89	6,06	2,37	1,19	0,87	
	Standardabw.	2,903	4,153	2,215	1,924	1,644	1,037	
autolog	MW (pg / ml)	22,29	25,35	13,62	12,37	12,77	11,31	6,72
	Standardabw.	25,311	32,993	18,161	22,105	23,696	16,164	12,124

		T - Test						
		18	22	26	30	34	38	42
Zellen / Telos	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p < 0,01	p > 0,05	p > 0,05		
Zellen / autolog	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	
Telos / autolog	p ≤ 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	

Tab. 14: IL-1 β -Werte im Verlauf der Mediumwechsel 15 bis 42 (die Mittelwerte der Kontrollkultur „nur Zellen“ sind mit angegeben).

Die Werte von Interleukin-1 β im Mediumüberstand der Kulturen „nur Zellen“ zeigen ein Maximum am ersten Mediumwechsel („nur Zellen“: 151,2 pg/ ml), wonach sie um den Nullwert liegen. Bei den „Telos“-Kulturen zeigt sich am ersten Mediumwechsel ein Maximum der IL-1 β -Werte („Telos“: 156,2 pg/ ml), anschließend liegen sie um den Nullwert. Zwischen der Kontrollkultur und der Kultur „Telos“ lassen sich keine signifikanten Unterschiede der Mittelwerte nachweisen.

Bei der Zellkultur „autolog“, die mit einem Wert von 6144,1 pg/ ml IL-1 β im Mediumüberstand am ersten Mediumwechsel den Mittelwert der Kontrollkultur circa 40fach übertrifft, fallen die Werte danach langsam ab, um am 7. Mediumwechsel ein relatives Minimum mit 13,9 pg/ ml zu erreichen. Bis zum 12. Mediumwechsel mit einem relativen Maximum von 33,4 pg/ ml steigt der Mittelwert von IL-1 β der autologen Kultur anschließend wieder an, um danach bis zum Ende des Beobachtungszeitraums kontinuierlich abzufallen.

Zwischen der autologen Zellkultur und den Kulturen „nur Zellen“ und „Telos“ besteht während der ersten vier Mediumwechsel ein „signifikanter“ bis „sehr signifikanter“ Unterschied, anschließend bis zum 8. Mediumwechsel ein „hochsignifikanter“ Unterschied. Danach errechnen sich bis zum 14. Mediumwechsel einschließlich wieder „signifikante“ bis „sehr signifikante“ Unterschiede, darauf werden keine signifikanten Unterschiede mehr beobachtet.

III.6.2 Interleukin-6 (IL-6)

Interleukin - 6 (IL - 6)		Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen						
		1	2	3	4	5	6	7
nur Zellen	MW (pg / ml)	10199,48	1167,81	506,08	501,65	639,08	1201,47	1624,70
	Standardabw.	9982,804	996,379	400,344	286,033	317,549	945,278	982,645
Telos	MW (pg / ml)	16434,97	3853,59	781,68	396,07	443,20	1074,61	2147,81
	Standardabw.	1201,312	992,404	148,245	108,120	157,836	582,088	893,092
autolog	MW (pg / ml)	2024502,16	1071612,51	580567,57	370979,02	217075,66	145755,33	107649,65
	Standardabw.	850288,061	307345,685	151387,777	78953,752	37324,685	33656,340	16548,751
		8	9	10	11	12	13	14
nur Zellen	MW (pg / ml)	3603,48	5946,25	7340,65	10167,18	11654,18	11945,07	13142,12
	Standardabw.	3323,807	5764,535	6059,633	7660,474	7050,085	6150,166	6505,146
Telos	MW (pg / ml)	3759,21	3444,61	4853,80	8400,27	16243,39	14369,44	16910,86
	Standardabw.	1417,871	1829,140	1778,564	5230,788	6417,139	4665,504	4976,948
autolog	MW (pg / ml)	90605,09	81481,82	72798,81	76363,10	66149,43	58688,87	62833,52
	Standardabw.	30576,160	27133,143	23968,036	16942,051	12613,471	13123,064	18715,003

T - Test							
	1	2	3	4	5	6	7
Zellen / Telos	p > 0,05	p < 0,001	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
Zellen / autolog	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
Telos / autolog	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
	8	9	10	11	12	13	14
Zellen / Telos	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
Zellen / autolog	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
Telos / autolog	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001

Tab. 15: IL-6 Werte im Verlauf der Mediumwechsel 1 bis 14 (die Ergebnisse des T-Tests sind mit angegeben).

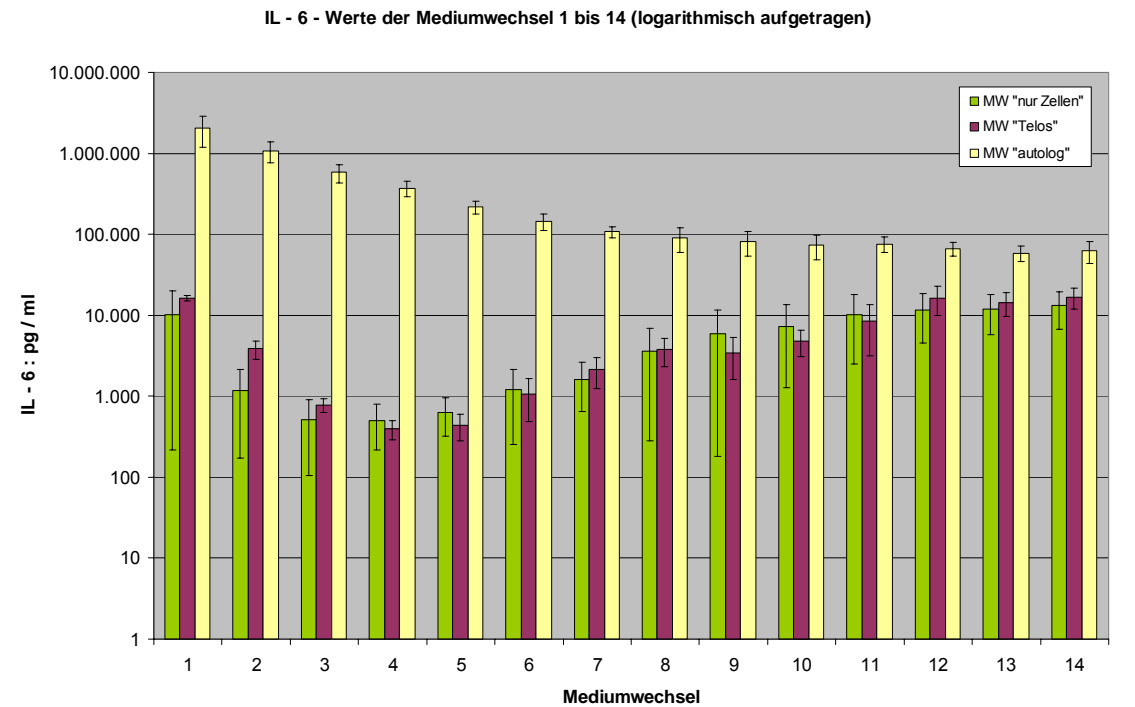


Abb. 32: IL-6-Werte im Verlauf der Mediumwechsel 1 bis 14 (die Daten sind aus Gründen der Übersicht logarithmisch aufgetragen).

Interleukin - 6 (IL - 6)		Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen						
		18	22	26	30	34	38	42
nur Zellen	MW (pg / ml)	13244,36	12634,96	11976,15	9861,05	8863,13	8847,08	6362,75
	Standardabw.	5392,578	6056,846	5740,020	4087,165	4858,347	5518,086	3826,034
Telos	MW (pg / ml)	16798,02	11634,44	11150,29	9687,10	9515,85	9242,41	9519,87
	Standardabw.	2858,892	2556,103	2986,070	1818,098	3210,097	3737,696	2752,918
autolog	MW (pg / ml)	34683,40	32495,89	28786,59	26877,63	24054,94	22977,10	20481,68
	Standardabw.	12028,385	7862,556	4139,523	3909,955	3542,714	6187,427	5185,331

T - Test							
	18	22	26	30	34	38	42
Zellen / Telos	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
Zellen / autolog	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
Telos / autolog	p < 0,01	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001

Tab. 16: IL-6-Werte im Verlauf der Mediumwechsel 15 bis 42 (die Ergebnisse des T-Tests sind mit angegeben).

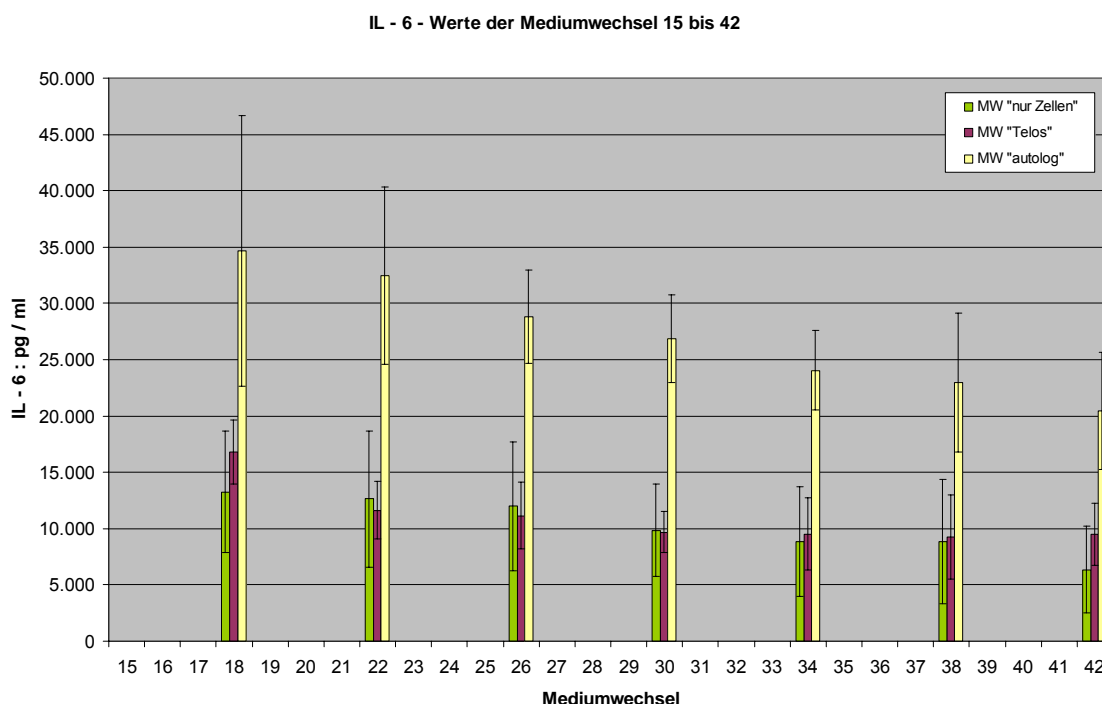


Abb. 33: IL-6-Werte im Verlauf der Mediumwechsel 15 bis 42.

Bei den Kulturen „nur Zellen“ zeigen die Mittelwerte des im Mediumüberstand bestimmten IL-6 ein relatives Maximum am 1. Mediumwechsel („nur Zellen“: 10.199,5 pg/ ml), ein absolutes Minimum am 4. Mediumwechsel („nur Zellen“: 501,7 pg/ ml) und einem Maximum am 18. Mediumwechsel bei „nur Zellen“ (13.244,4 pg/ ml).

Die Mittelwerte der IL-6 Mengen im Mediumüberstand der Kulturen „Telos“ zeigen ein relatives Maximum am 1. Mediumwechsel („Telos“: 16.435,0 pg/ ml), am 4. Mediumwechsel ein absolutes Minimum mit 396,1 pg/ ml und ein Maximum am 14. Mediumwechsel bei 16.910,9 pg/ ml.

Ein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten der Kontrollkultur und der Zellkultur „Telos“ lässt sich außer am 2. Mediumwechsel nicht nachweisen.

Die „autologe“ Zellkultur beginnt mit einem absoluten Maximum der gemessenen IL-6-Werte im Medium am 1. Mediumwechsel mit 2.024.502,2 pg/ ml, wonach die im Medium enthaltene Menge IL-6 kontinuierlich bis zu einem Minimum am 42. Mediumwechsel (20.481,7 pg/ ml) abfällt.

Es bestehen über den gesamten Versuchszeitraum „hochsignifikante“ Unterschiede zwischen den Mittelwerten der „autologen“ Zellkultur und den Kulturen „nur Zellen“ bzw. „Telos“. Einzige Ausnahme bilden die am 18. Mediumwechsel gemessenen IL-6-Werte von „autolog“ und „Telos“, an denen ein „sehr signifikanter“ Unterschied nachgewiesen wird.

III.6.3 Tumornekrosefaktor- α (TNF α)

Tumornekrosefaktor - alpha (TNF - a)		Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen						
		1	2	3	4	5	6	7
nur Zellen	MW (pg / ml)	9,87	0,00	0,00	0,17	0,00	0,00	3,90
	Standardabw.	13,212	0,000	0,000	0,452	0,000	0,000	10,322
Telos	MW (pg / ml)	17,68	0,57	0,93	1,60	0,00	0,00	0,79
	Standardabw.	3,450	1,602	2,640	3,092	0,000	0,013	2,239
autolog	MW (pg / ml)	28,35	0,50	0,00	0,06	0,00	0,05	0,00
	Standardabw.	21,344	0,807	0,000	0,173	0,000	0,117	0,000
		8	9	10	11	12	13	14
nur Zellen	MW (pg / ml)	0,00	0,00	0,00	0,00	1,53	0,00	0,00
	Standardabw.	0,000	0,000	0,000	0,000	4,061	0,000	0,000
Telos	MW (pg / ml)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Standardabw.	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
autolog	MW (pg / ml)	0,00	0,00	0,00	0,16	0,03	0,12	0,08
	Standardabw.	0,000	0,000	0,000	0,403	0,087	0,336	0,229

T - Test		1	2	3	4	5	6	7
Zellen / Telos	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05			p > 0,05	p > 0,05
Zellen / autolog	p > 0,05	p > 0,05		p > 0,05			p > 0,05	p > 0,05
Telos / autolog	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05			p > 0,05	p > 0,05
		8	9	10	11	12	13	14
Zellen / Telos						p > 0,05		
Zellen / autolog					p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
Telos / autolog					p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05

Tab. 17: TNF α Werte im Verlauf der Mediumwechsel 1 bis 14 (die Ergebnisse des T-Tests sind mit angegeben).

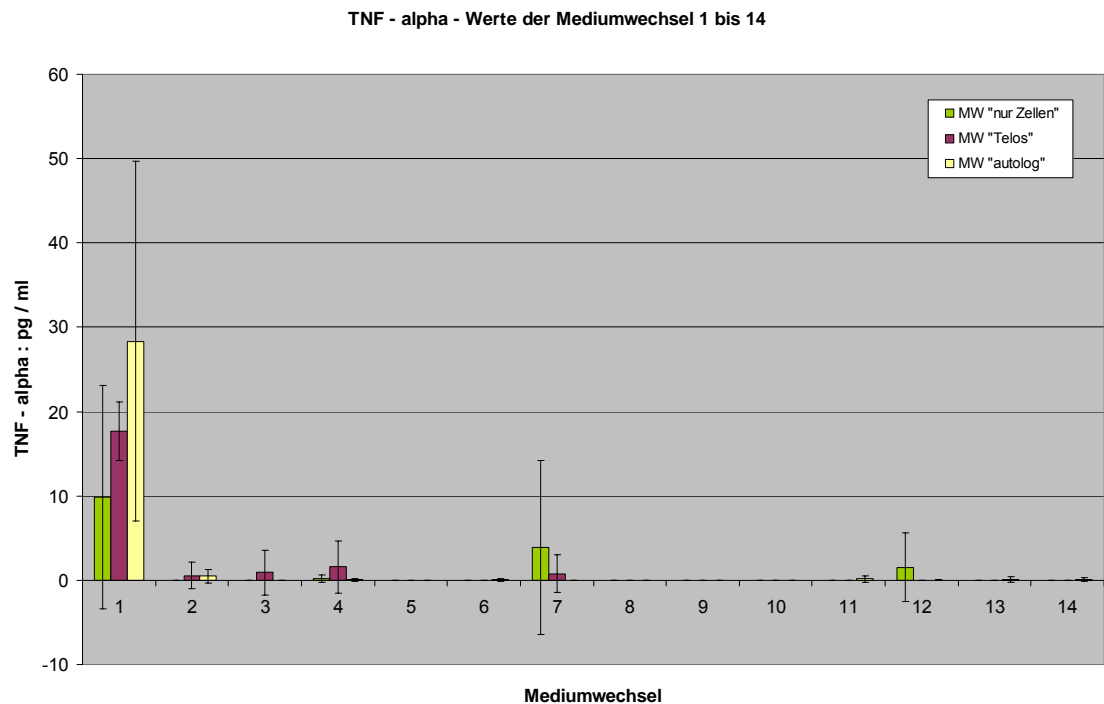


Abb. 34: TNFα Werte im Verlauf der Mediumwechsel 1 bis 14.

Tumornekrosefaktor - alpha (TNF - a)		Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen						
		18	22	26	30	34	38	42
nur Zellen	MW (pg / ml)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Standardabw.	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Telos	MW (pg / ml)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	Standardabw.	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
autolog	MW (pg / ml)	0,07	0,10	0,04	0,01	0,31	0,00	0,00
	Standardabw.	0,194	0,283	0,079	0,016	0,521	0,000	0,012

		T - Test						
		18	22	26	30	34	38	42
Zellen / Telos								
Zellen / autolog	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05		p > 0,05
Telos / autolog	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05		

Tab. 18: TNFα Werte im Verkauf der Mediumwechsel 15 bis 42 (die Ergebnisse des T-Tests sind mit angegeben).

Im Rahmen der Messungen von TNFα ergibt sich ein einheitliches Bild in sämtlichen Kulturen. So kann nur am ersten Tag eine geringe Menge TNFα im Mediumüberstand nachgewiesen werden. Anschließend liegen alle Messwerte um den Nullwert. Ein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Mittelwerten kann zu keiner Zeit errechnet werden.

III.6.4 Interferon-γ (IFNγ)

Interferon - gamma (IFN - g)		Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen						
		1	2	3	4	5	6	7
nur Zellen	MW (pg / ml)	3,00	0,31	1,16	1,30	0,63	1,04	0,47
	Standardabw.	3,029	0,509	3,043	2,354	1,259	2,744	1,250
Telos	MW (pg / ml)	0,04	0,52	2,20	1,91	0,29	0,10	0,00
	Standardabw.	0,082	0,790	3,498	2,237	0,566	0,292	0,000
autolog	MW (pg / ml)	36,34	22,36	14,34	7,11	2,93	2,56	2,29
	Standardabw.	35,547	20,099	14,753	5,461	2,817	2,374	1,879
		8	9	10	11	12	13	14
nur Zellen	MW (pg / ml)	0,19	0,21	0,13	0,30	0,10	0,12	0,00
	Standardabw.	0,515	0,549	0,296	0,771	0,277	0,318	0,000
Telos	MW (pg / ml)	0,47	0,00	0,02	0,13	0,18	0,00	0,00
	Standardabw.	0,915	0,000	0,064	0,372	0,235	0,000	0,000
autolog	MW (pg / ml)	2,73	3,36	6,56	9,93	9,74	16,00	12,62
	Standardabw.	2,288	2,738	3,941	8,162	9,196	12,837	7,859

T - Test							
	1	2	3	4	5	6	7
Zellen / Telos	p ≤ 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
Zellen / autolog	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p ≤ 0,05
Telos / autolog	p ≤ 0,05	p < 0,01	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p < 0,01
	8	9	10	11	12	13	14
Zellen / Telos	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	
Zellen / autolog	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p < 0,001	p < 0,01	p ≤ 0,05	p < 0,01	p < 0,001
Telos / autolog	p ≤ 0,05	p < 0,01	p < 0,001	p < 0,01	p ≤ 0,05	p < 0,01	p < 0,001

Tab. 19: IFNγ-Werte im Verlauf der Mediumwechsel 1 bis 14 (die Ergebnisse des T-Tests sind mit angegeben).

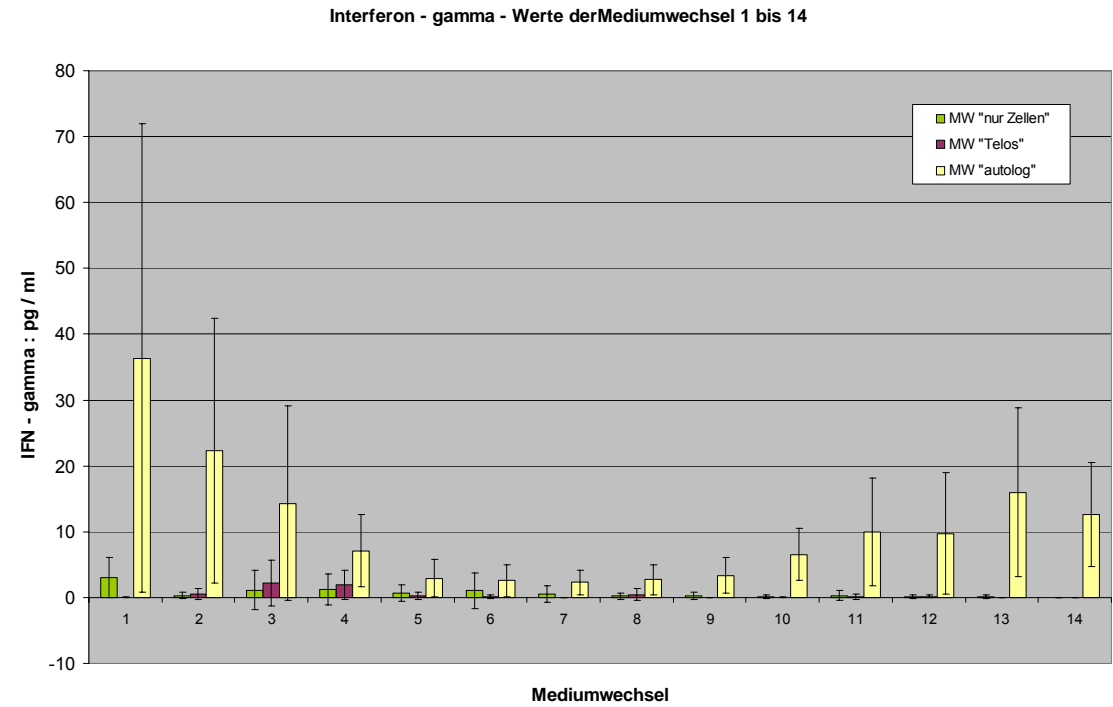


Abb. 35: IFNγ-Werte im Verlauf der Mediumwechsel 1 bis 14.

Interferon - gamma (IFN - g)		Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen						
		18	22	26	30	34	38	42
nur Zellen	MW (pg / ml)	0,10	0,80	0,06	0,00	0,87	0,16	0,35
	Standardabw.	0,245	1,517	0,099	0,001	1,558	0,346	0,916
Telos	MW (pg / ml)	0,00	0,11	0,00	0,00	0,00	1,10	0,00
	Standardabw.	0,000	0,225	0,000	0,000	0,000	3,110	0,000
autolog	MW (pg / ml)	10,98	14,46	11,77	12,41	11,94	10,13	8,50
	Standardabw.	10,624	13,026	8,294	8,224	11,202	8,691	5,319

		T - Test						
		18	22	26	30	34	38	42
Zellen / Telos		p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
Zellen / autolog		p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p < 0,01	p < 0,01	p ≤ 0,05	p < 0,01	p < 0,01
Telos / autolog		p ≤ 0,05	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,001	p < 0,01	p ≤ 0,05	p < 0,001

Tab. 20: IFN γ -Werte im Verlauf der Mediumwechsel 15 bis 42 (die Ergebnisse des T-Tests sind mit angegeben).

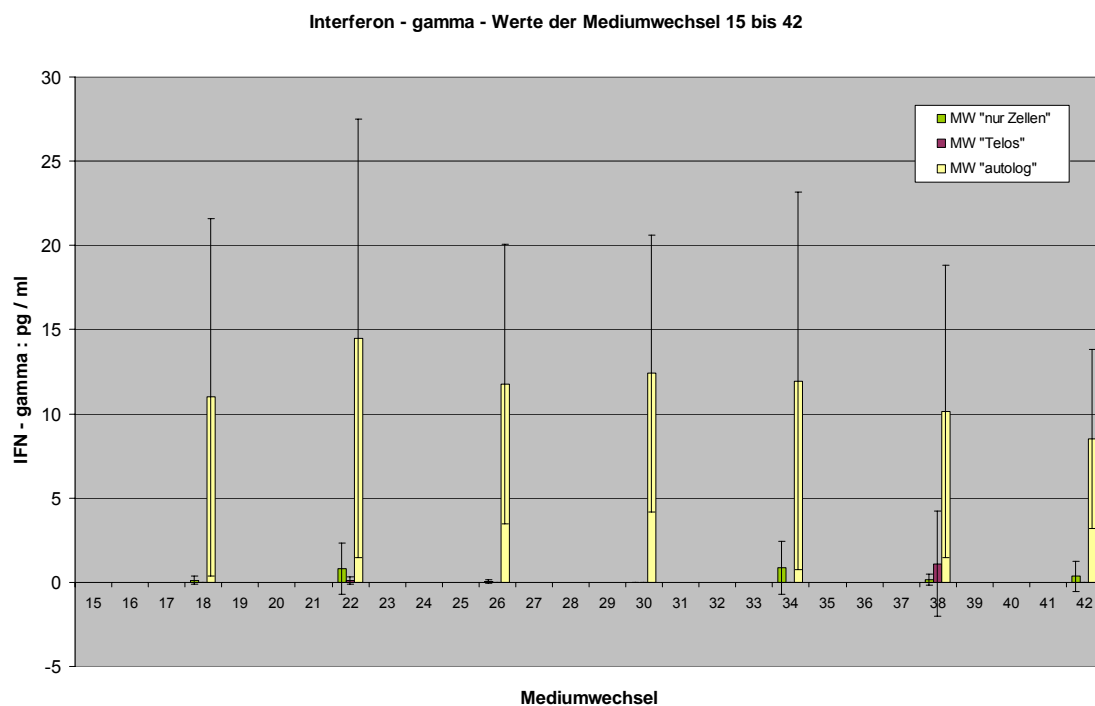


Abb. 36: IFN γ -Werte im Verlauf der Mediumwechsel 15 bis 42.

In den Zellkulturen „nur Zellen“ und „Telos“ ließen sich während des gesamten Untersuchungszeitraums keine stichhaltigen Mengen Interferon- γ nachweisen.

Im Mediumüberstand der „autologen“ Kultur konnte IFN γ nachgewiesen werden. Der Verlauf zeigt ein absolutes Maximum der IFN γ Werte am ersten Mediumwechsel (36,3 pg/ ml), einen Abfall bis zu einem absoluten Minimum von 2,3 pg/ ml am 7. Mediumwechsel mit anschließendem Anstieg auf ein relatives Maximum von 14,5 pg/

ml am 22. Mediumwechsel und folgendem langsamen Abfall der Mittelwerte bis zum Ende des Beobachtungszeitraums.

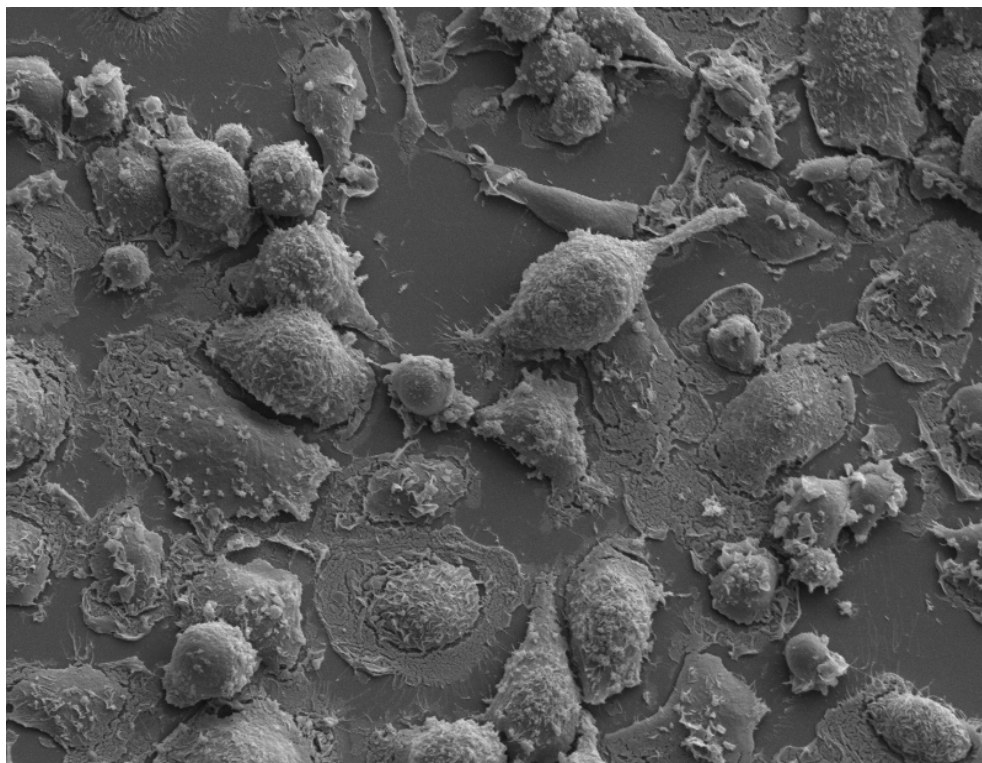
Die Unterschiede zwischen den Mittelwerten, die aus den Messungen der „autologen“ Kultur ermittelt wurden und den IFN γ -Mittelwerten der Kulturen „nur Zellen“ und „Telos“, sind stets signifikant.

III.7 Rasterelektronische Bilder der Zellkultur nach 12 Wochen

Nach dem Versuch über 12 Wochen wurden einige Proben für die rasterelektronenmikroskopische Betrachtung weiterbearbeitet, um einen besseren Aufschluss über das Wachstumsverhalten im Knochen zu erhalten. Auch wurden einige Bilder von Nullproben der autologen Knochenprobenkörper angefertigt.

Die Auswertung zeigt, dass sich in allen Fällen extrazelluläre Matrix gebildet hat und Zellen im Falle von vorhandenen Knochenprobenkörpern auch in diese eingewandert sind. Bei den autologen Knochenprobenkörpern ist nach der 12-wöchigen Zellkultur eine Verminderung der intertrabekulären Fettzellen zu beobachten.

III.7.1 Kontrollkultur „nur Zellen“



Nur Zellen 12 Wochen 450-fach

60 μm

Abb. 37: Rasterelektronenmikroskopie der Kontrollkultur „nur Zellen“ nach 12 Wochen.

III.7.2 Zellkultur „Telos“

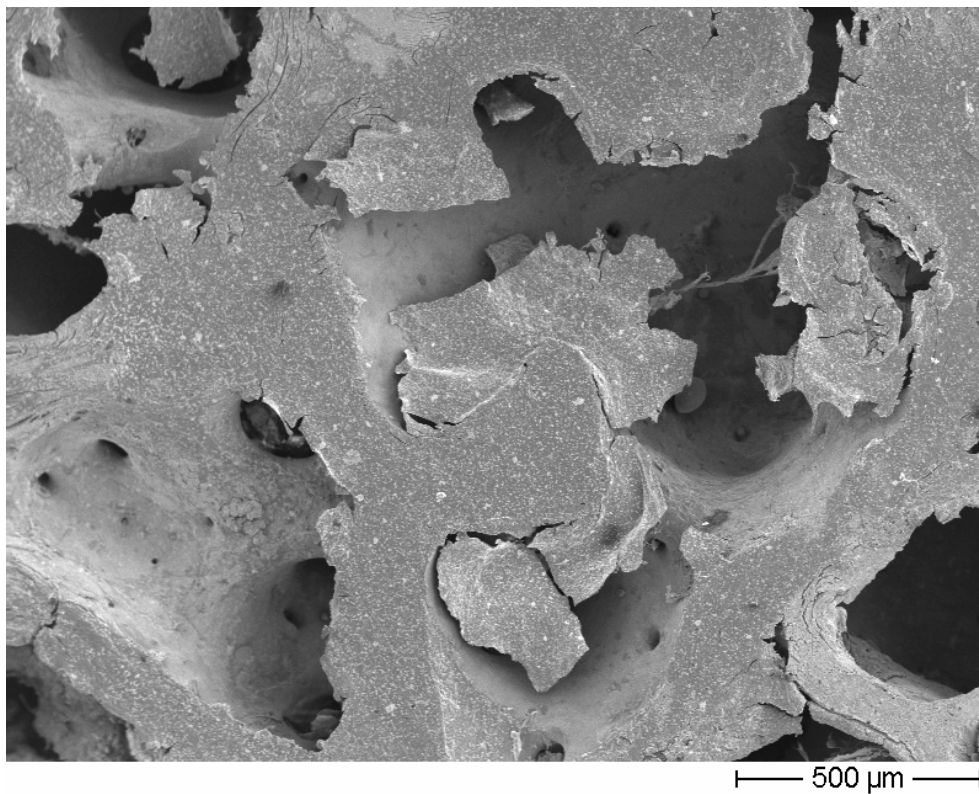


Abb. 38: Rasterelektronenmikroskopie der Nullprobe eines „Telos“-Knochenplättchens.

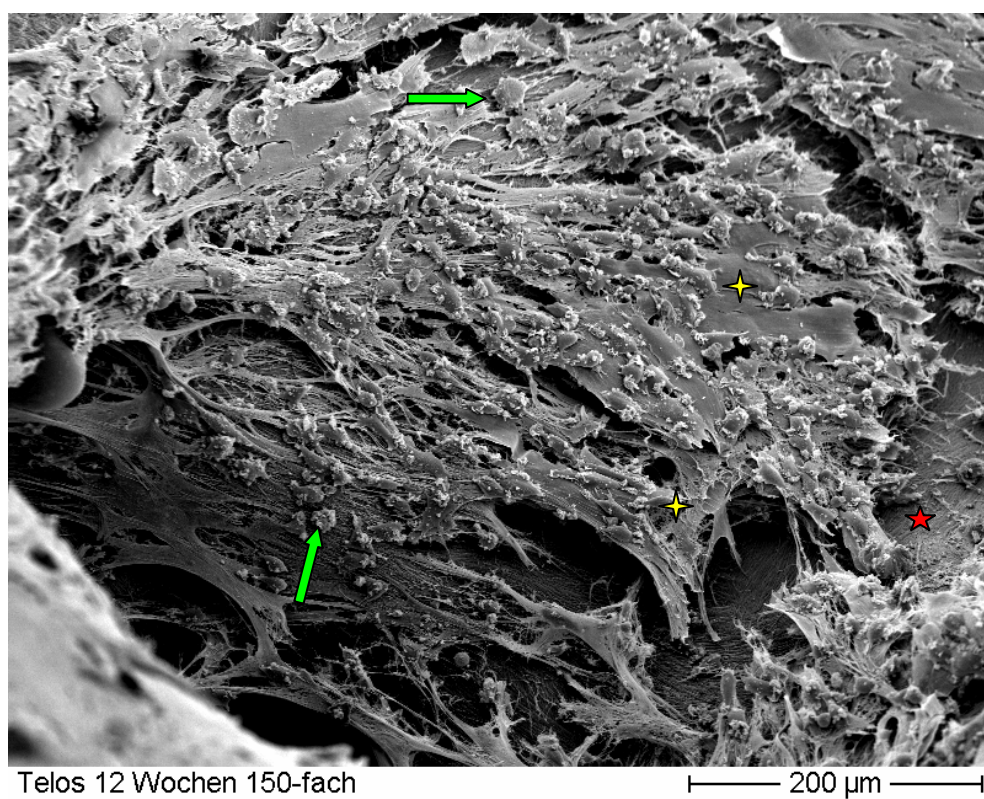
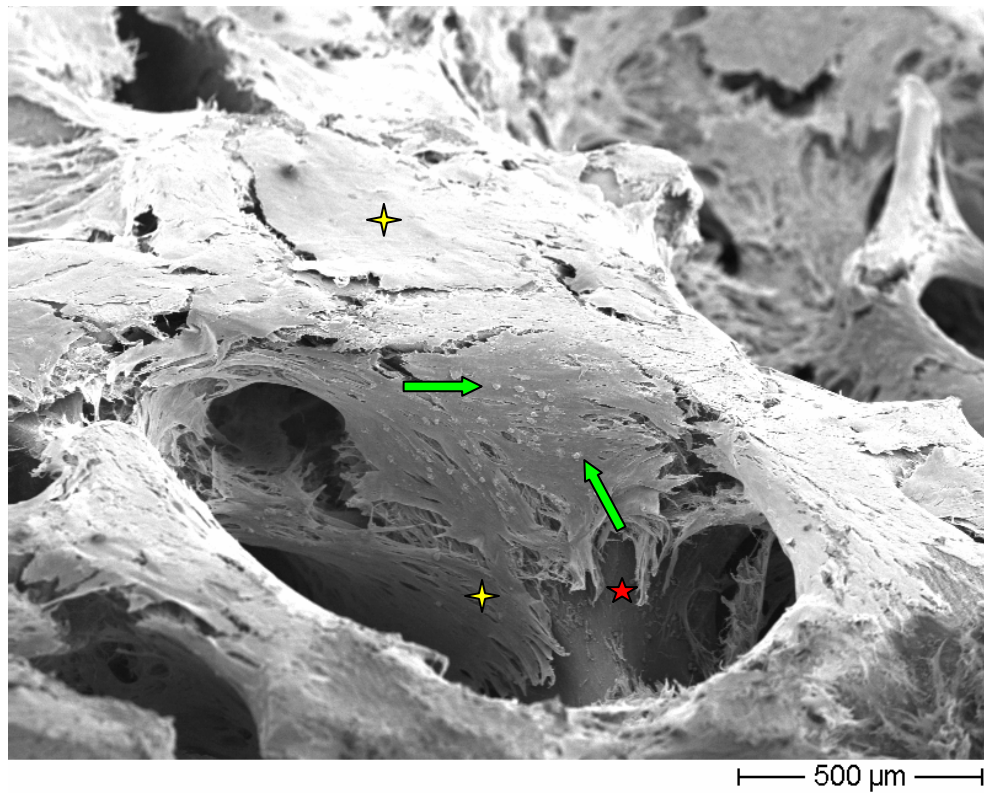





Abb. 39 und 40: Rasterelektronenmikroskopie der Zellkultur „Telos“ nach 12 Wochen,

- | | | |
|---|---|------------------------|
|  | = | Zellen, |
|  | = | extrazelluläre Matrix, |
|  | = | alte Knochenmatrix. |

3.7.3 Zellkultur „autolog“

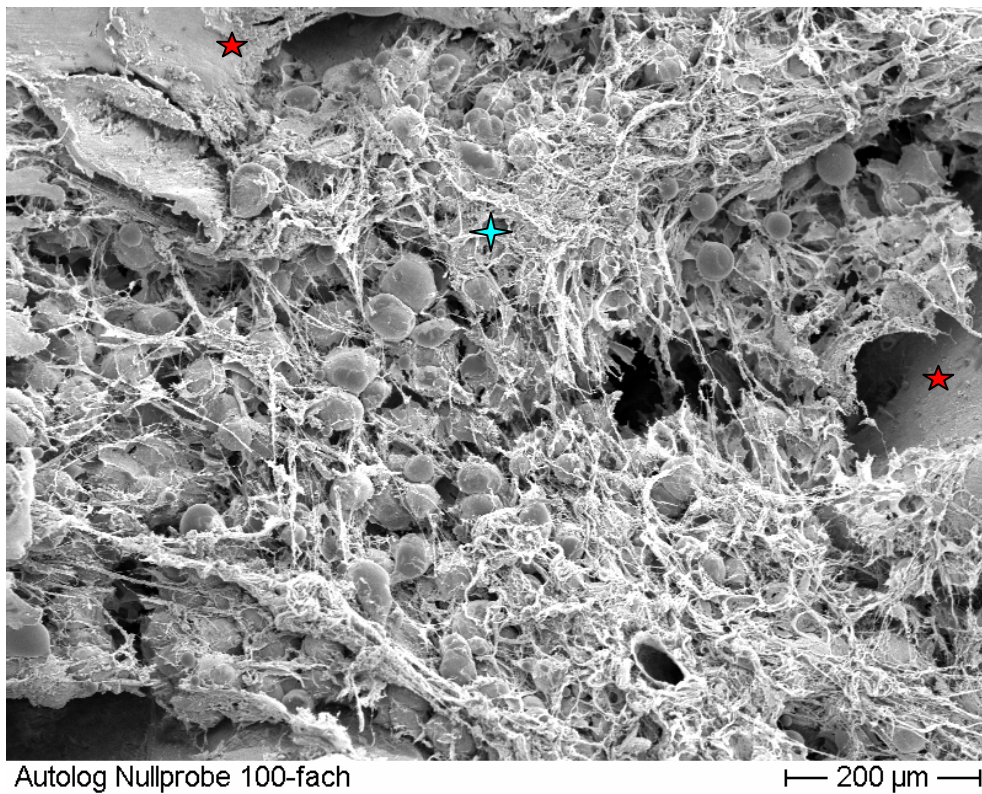
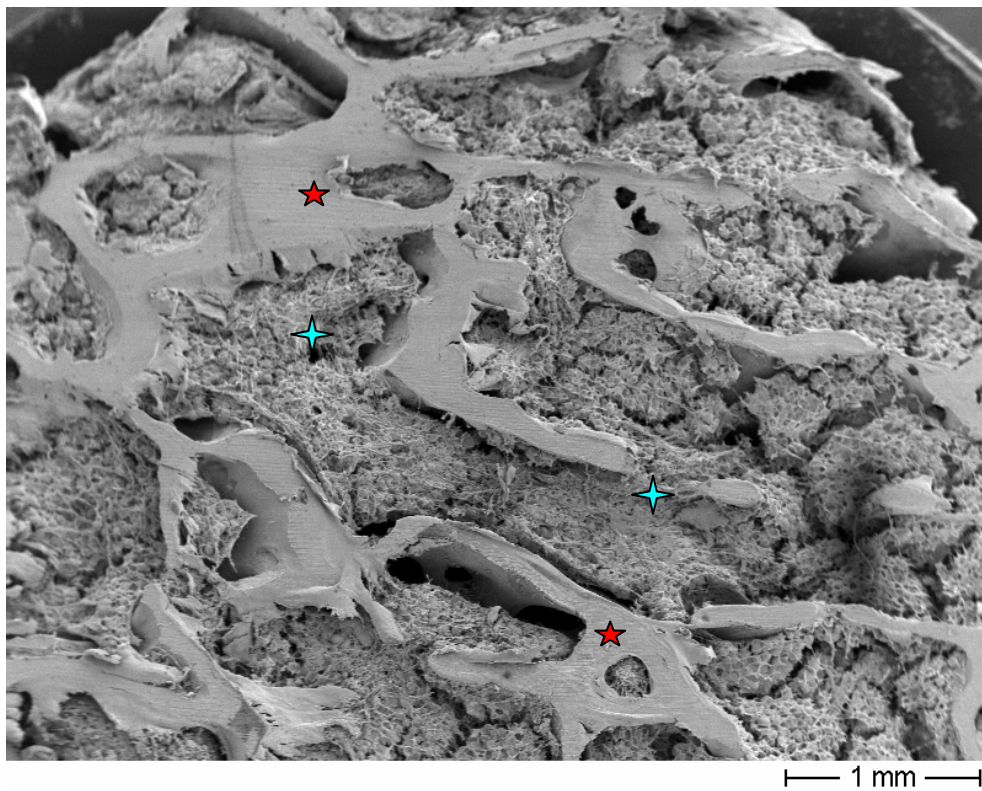


Abb. 41 und 42: Rasterelektronenmikroskopie der Nullprobe eines autologen Knochenplättchens,

- ★ = alte Knochenmatrix / Schnittkante
- ★ = bereits vorhandene Matrix zwischen den Trabekeln.

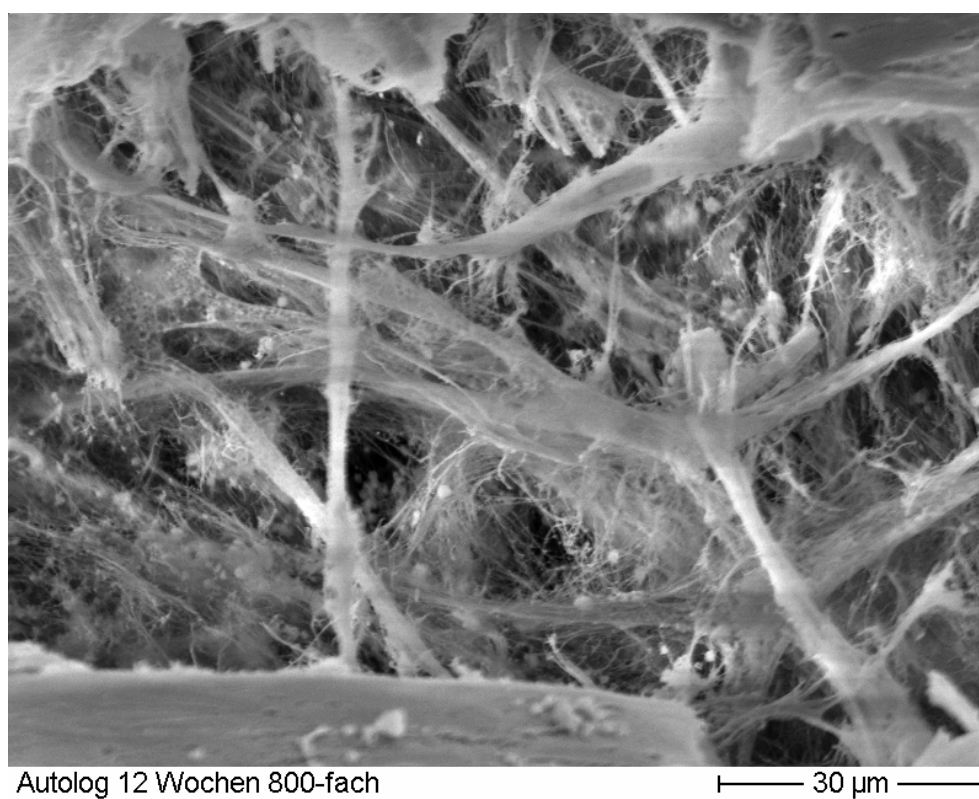
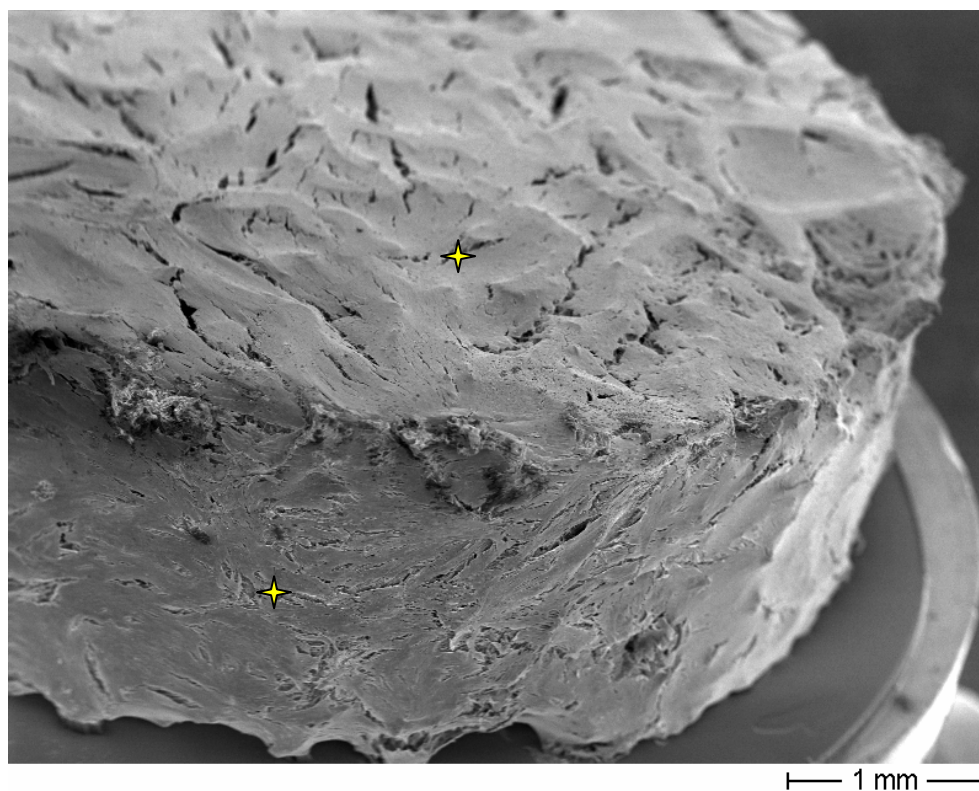


Abb. 43 und 44: Rasterelektronenmikroskopie der „autologen“ Knochenplättchen nach 12 Wochen

✦ = neu gebildete extrazelluläre Matrix.

III.8 Giemsa-gefärbte Bilder der Zellkultur nach 12 Wochen

Einige Zellkulturen wurden nach der 12-wöchigen Zellkultur mit Giemsa angefärbt, um eine bessere Darstellung der Zellen zu ermöglichen. Eine Darstellung der Zellen direkt im Knochenplättchen war auf Grund der dichten extrazellulären Matrix nicht möglich, so dass lediglich Zellen auf dem Wellboden oder zwischen zwei Probenkörpern gezeigt werden können.

III.8.1 Kontrollkultur „nur Zellen“

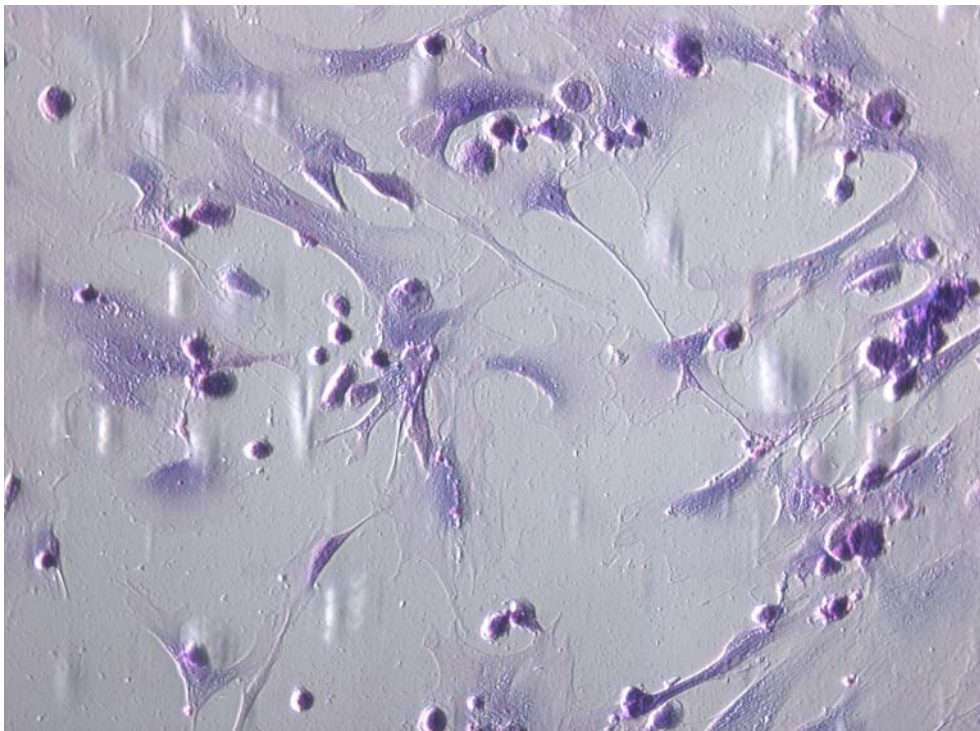


Abb. 45: Giemsa-Färbung von „nur Zellen“ nach 12 Wochen (100fache Vergrößerung, CZ3 Giemsa 03).

III.8.2 Zellkultur „Telos“

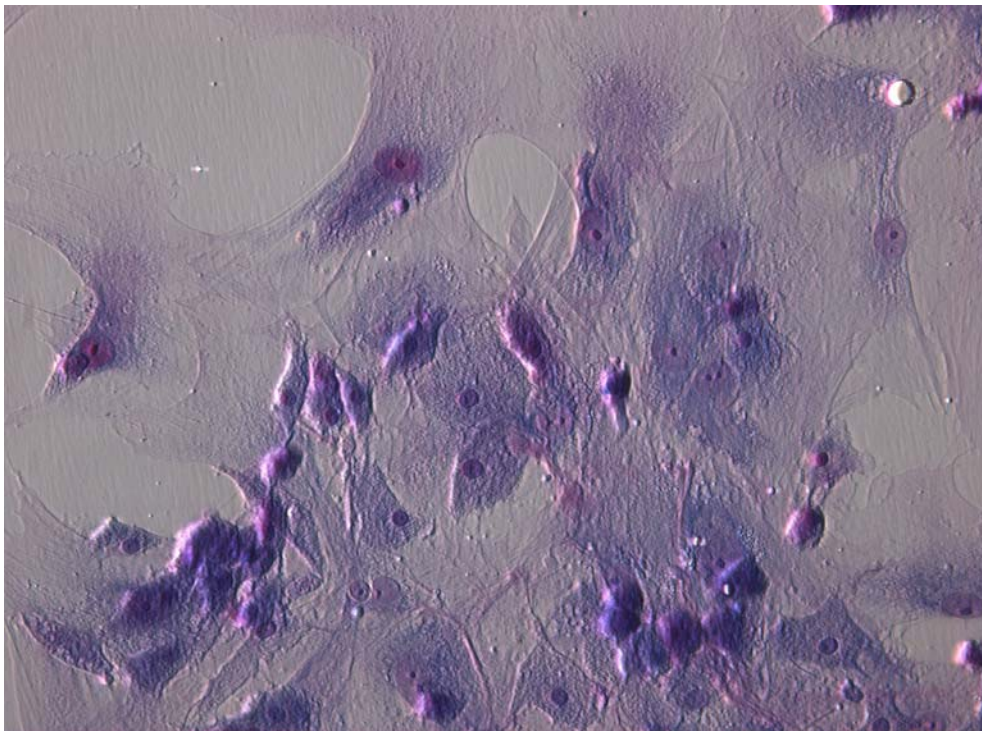


Abb. 46: Giemsa-Färbung von „Telos“ nach 12 Wochen (100fache Vergrößerung, CIII4 Giemsa 06).

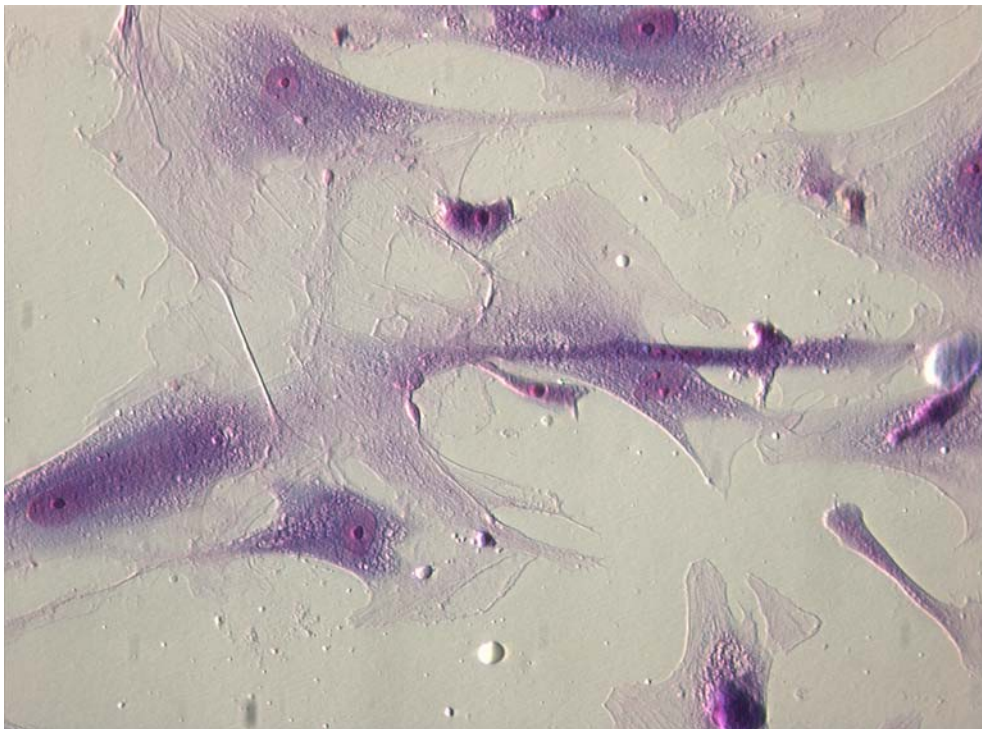


Abb. 47: Giemsa-Färbung von „Telos“ nach 12 Wochen (200fache Vergrößerung, CIV6 Giemsa 07).

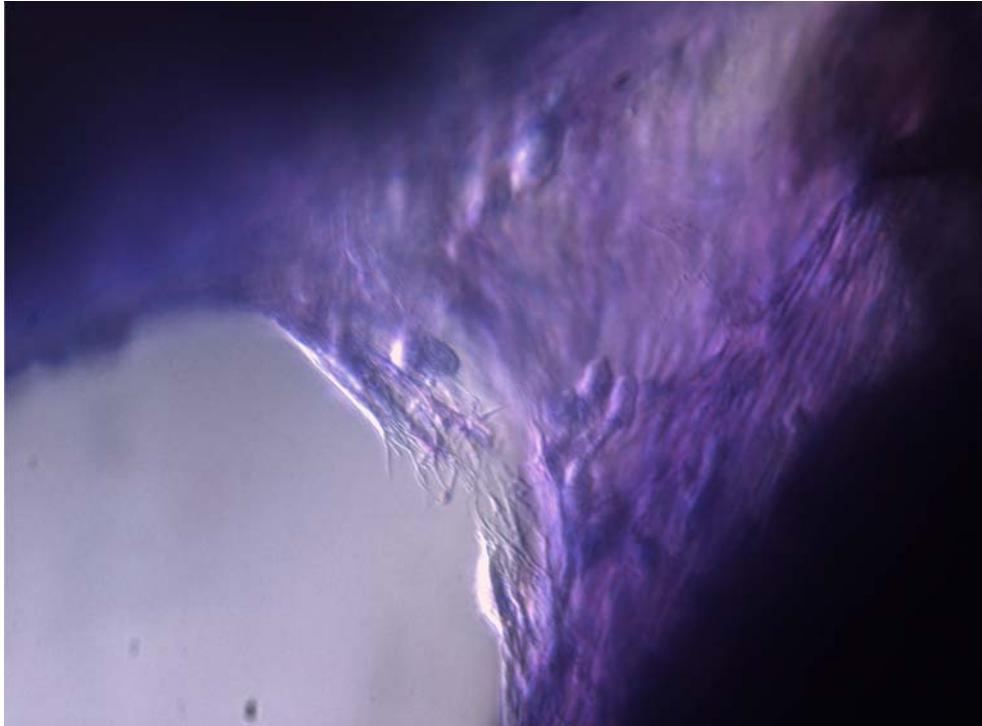


Abb. 48: Giemsa-Färbung von „Telos“ nach 12 Wochen (200fache Vergrößerung, CIV6 Giemsa 09). Deutlich ist die Verbindung zwischen zwei Knochenplättchen zu erkennen.

III.8.3 Zellkultur „autolog“

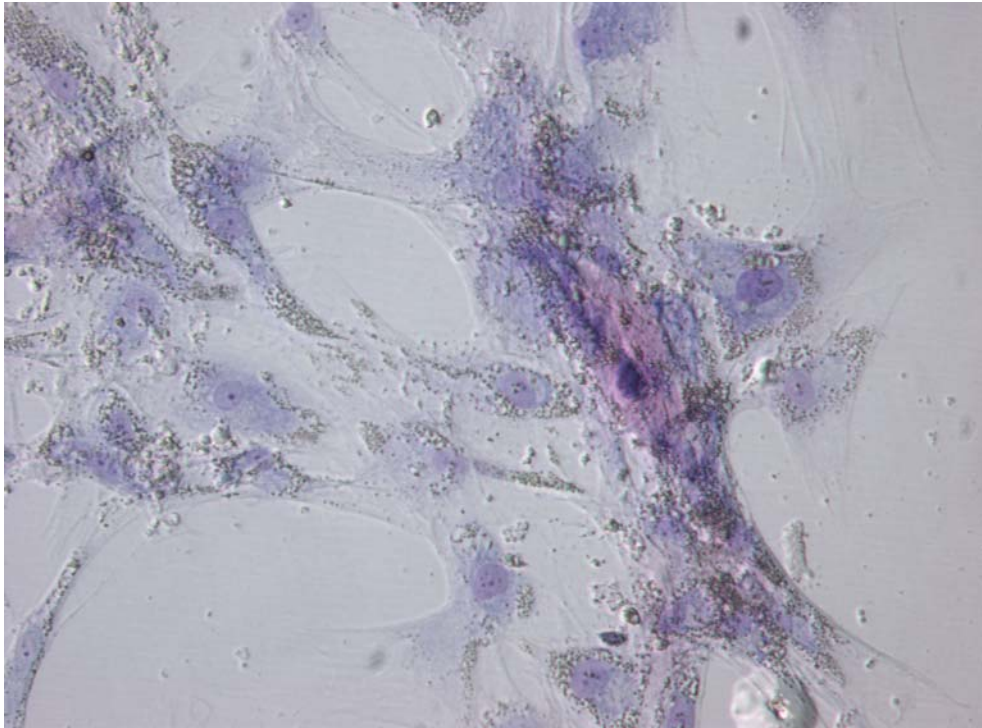


Abb. 49: Giemsa-Färbung eines „autologen“ Präparates nach 12 Wochen (200fache Vergrößerung, CVI6 Giemsa 03).

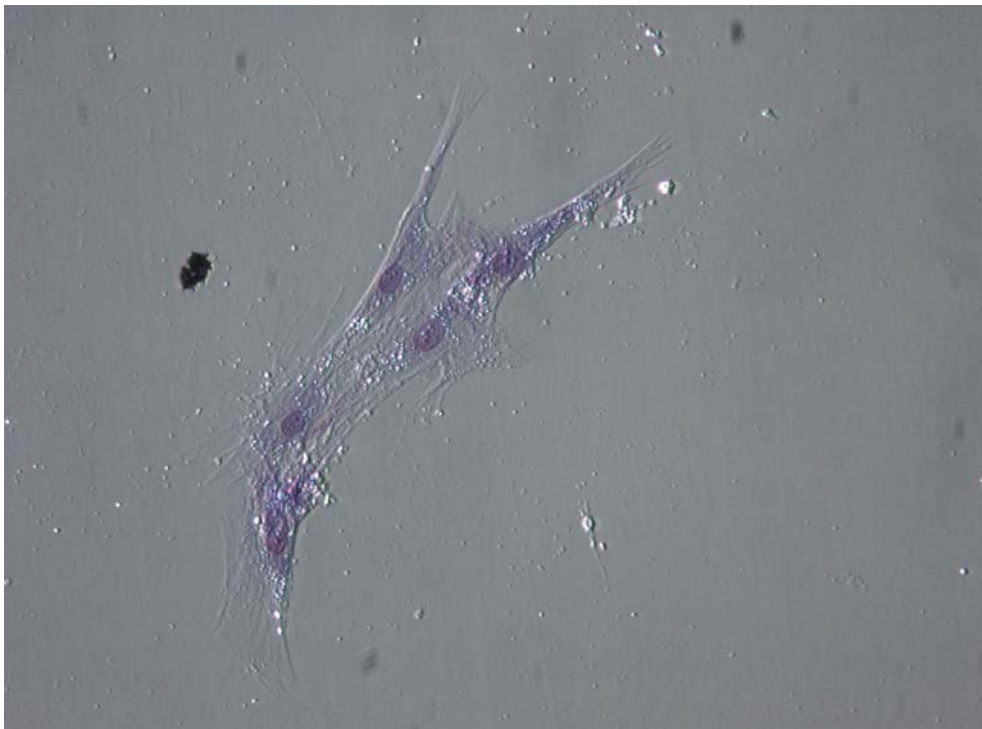


Abb. 50: Giemsa-Färbung eines „autologen“ Präparates nach 12 Wochen (200fache Vergrößerung, CVI6 Giemsa 04).

III.9 Schnittbilder nach Technoviteinbettung

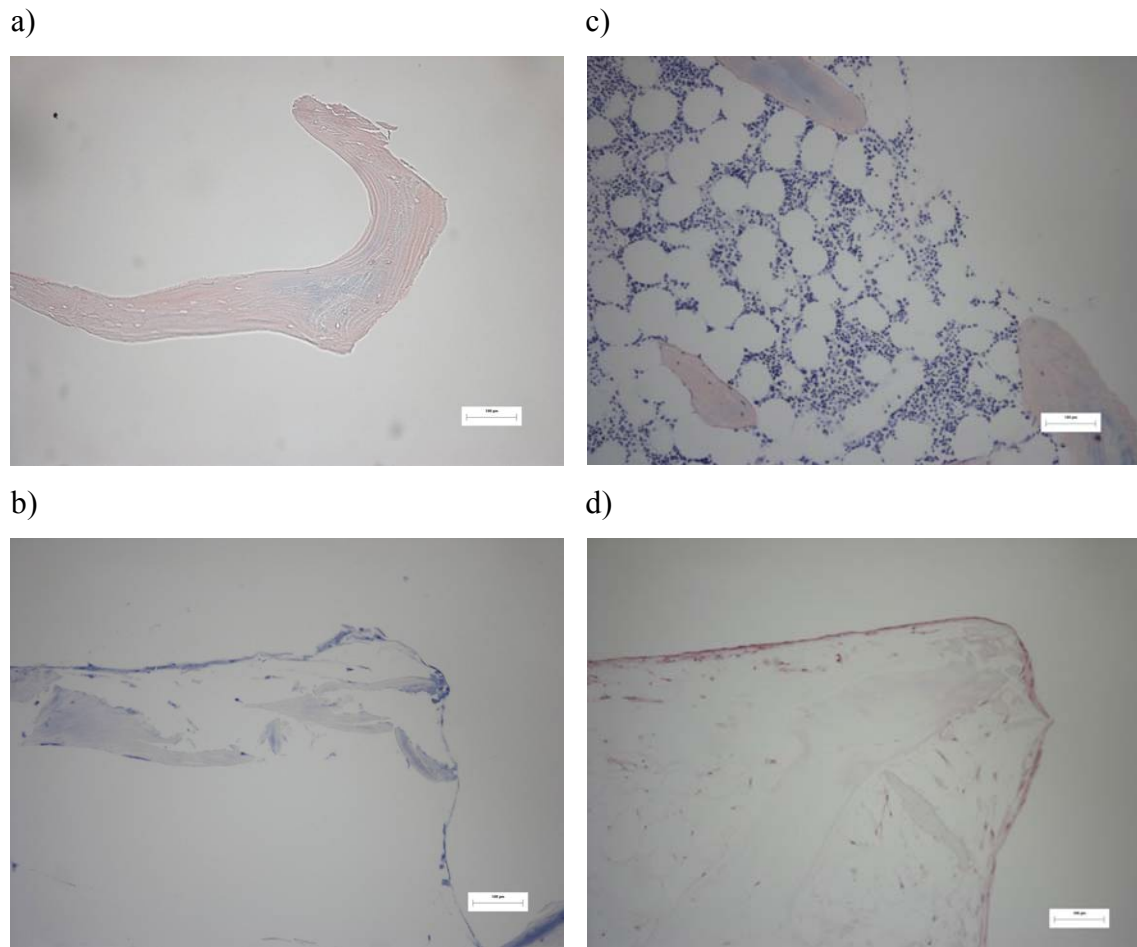


Abb. 51: Schnittbilder nach Technoviteinbettung

- a) Nullprobe eines nach dem Telos-Verfahren behandelten Knochenplättchens (Giemsa-Färbung, 100fache Vergrößerung),
- b) Giemsa gefärbter Schnitt durch ein Knochenplättchen der Kultur „Telos“ nach 12 Wochen Zellkultur (100fache Vergrößerung),
- c) Nullprobe eines autologen Knochenplättchens (Giemsa-Färbung, 100fache Vergrößerung),
- d) Schnitt durch ein autologes Knochenplättchen nach 12-wöchiger Zellkultur (Fuchsinfärbung, 100fache Vergrößerung).

IV. Diskussion

IV.1 Allgemeine Betrachtungen

In der aktuellen Literatur finden sich kaum Aussagen über die Biokompatibilität allogener Knochentransplantate abhängig von deren vorheriger Prozessierung. Allerdings gibt es sehr wohl Belege für den Einfluss des Sterilisationsverfahrens auf die osteoinduktiven und biomechanischen Eigenschaften der Knochentransplantate [Bauer & Muschler 2000; Boyce et al 1999; Shin et al 2005]. Unter dem Begriff „Biokompatibilität“ wird hierbei die Freisetzung von Substanzen in nicht-toxischen Konzentrationen verstanden, durch die eine Einkapselung oder schwache Entzündungsreaktion ausgelöst werden kann [Schenk 1986]. Eine Immunantwort ist für die optimale Einheilung eines Transplantats notwendig, schon Wintermantel et al ordneten ein Knochentransplantat bzw. einen Knochenersatzstoff ohne Immunantwort als bioinert ein [Wintermantel & Suk-Woo 2002].

Die höchste Biokompatibilität ist klar dem autologen Knochentransplantat zuzuweisen. Es stellt die natürlichste Methode und auch nach wie vor den Goldstandard dar. Allerdings steht es bei vielen Patienten auf Grund der im Alter häufigen Begleiterkrankungen (z. B. Osteoporose) nicht in der benötigten Menge oder Qualität zur Verfügung. Allogene Knochentransplantate haben zwar die osteogenen Eigenschaften verloren, sind jedoch meist noch osteokonduktiv und meist auch osteoinduktiv wirksam [Wintermantel & Suk-Woo 2002]. Eine Übertragung solcher osteoinduktiven Merkmale auf synthetische Materialien wird in jüngster Vergangenheit erforscht. Sowohl autologen als auch allogenen Knochentransplantaten ist die physiologische Architektur gemein, deren Morphologie ein ideales Leitsystem für die knöcherne Durchbauung bietet. Während dieses Prozesses wird der Resorbierbarkeit des Knochentransplantats große Bedeutung zugemessen, da im Regelfall ein durch Osteoklasten gesteuerter Knochenabbau dem osteoblastenabhängigen Knochenaufbau vorangeht. Durch frei werdende Substanzen, wie z. B. bone morphogenic proteins (BMP), kommt es zu einer Anregung der Proliferation von Mesenchymzellen und deren Weiterdifferenzierung zu Osteoblasten [Reddi 1998].

Aus diesem Grund wird die autologe Knochentransplantation in der vorliegenden Studie als Goldstandard angesehen und die anderen Sterilisationsverfahren mit dieser verglichen. Zur Erhebung von „Nullwerten“ wurde eine Zellkultur nur mit humanen Knochenmarkszellen angesetzt.

Um Reaktionen der Zellen des Wirtsorganismus auf solche eingebrachten Fremdmaterialien zu testen, wie die zur Versorgung von Knochendefekten eingebrachten Knochentransplantate sie darstellen, steht zu allererst die Überlegung an, mit welchen Zellarten dieses Material im Körper in Kontakt kommt. So kann der geeignete Versuchsaufbau geplant werden.

Da das Transplantat in traumatisch oder chirurgisch alterierten Knochen eingebracht wird, gehen wir in unserer Untersuchung davon aus, dass dieses Material nicht nur mit einem Zelltyp in Kontakt kommt, sondern mit einer Vielzahl verschiedener Zellarten in unterschiedlichsten Differenzierungsstufen. Daher entschieden wir uns für die Durchführung einer in vitro Studie in Form einer humanen Knochenmarkszellkultur, da die damit repräsentierten Zelltypen auch bei physiologischen Einheilungsvorgängen die größte Relevanz zu haben scheinen und die beobachteten Reaktionen gut auf die in vivo Abläufe am Menschen übertragbar sind. Zudem wird isolierten Knochenmarkszellen ein osteogenes Potential bei guter Proliferations- und Differenzierungsfähigkeit zugeschrieben [Ciapetti et al 2006].

Diese Form der Zellkultur genügt nach Erkenntnissen jüngerer Studien, die sich mit der Biokompatibilitätsprüfung anhand Zellkulturen primär ortständiger Knochenmarkszellen befassen, höchsten Ansprüchen [Wilke et al 1991, 1993, 1999, 2000].

Neben den beschriebenen Vorteilen dieses Modells müssen allerdings auch die hohen Kosten berücksichtigt werden, die nur die Planung kleinerer Versuchsdesigns erlauben. Hoher Aufwand und Kosten sind jedoch allen Zellkulturverfahren und auch Tierversuchen gemein, wobei letztere auch unter ethischen Gesichtspunkten nicht optimal geeignet sind, während die bei der vorliegenden Studie verwendete Knochenmarkszellkultur beinahe als Nebenprodukt einer regulären Totalendoprothese des Hüftgelenks angesehen werden kann.

Auch sind durch Tierversuche erhobene Daten nur begrenzt auf den Menschen übertragbar, zum großen Teil bedingt durch die unterschiedlichen Reaktionsweisen der

tierischen Zellen und zum anderen durch vom Menschen abweichende immunpathologische Prozesse beim Tier.

Im Folgenden werden zuerst die gewonnenen Daten im Hinblick auf die in der Fachliteratur beschriebenen Effekte der einzelnen Parameter diskutiert. Im Anschluss erfolgt eine Einordnung der gewonnenen Erkenntnisse zu anderen Studien, die sich mit diesem Thema beschäftigten.

IV.2 Diskussion der Ergebnisse

IV.2.1 pH-Werte und Lactat

In der vorliegenden Studie wurde der pH-Wert jeweils am Tag des Mediumwechsels im abgenommenen Medium bestimmt. Durch Betrachtung der pH-Werte der mit Knochenplättchen oder nur Zellen versehenen Kulturen relativ zum pH-Wert der „nur Medium“-Kulturen lassen sich Aussagen über Stress oder Zellumsatzvorgänge in der jeweiligen Kultur treffen. So zeigt ein relativ gesehen niedrigerer pH-Wert erhöhten Stress bzw. gesteigerte Arbeitsleistung (z. B. resorptive oder osteoklastäre Vorgänge) der beinhaltenen Zellen an. Lactat wurde als Indikator für Stress der kultivierten Zellen im Mediumüberstand bestimmt. So kann ein Anstieg von Lactat im Medium z. B. Hinweis für ein Problem der Sauerstoffversorgung sein.

Der pH-Wert hat einen Einfluss auf die Vorgänge bei der Knochenreparation. Zum einen wird die Osteoklastenaktivität durch einen niedrigen pH-Wert gesteigert, zum anderen die DNA- und Kollagensynthese der Osteoblasten durch eine saure Umgebung gemindert [Krieger et al 1992; Kaysinger & Ramp 1998].

Die Gefäßneubildung ist essentieller Bestandteil der Frakturheilung und wird durch das Zusammenspiel von Zellen, Wachstumsfaktoren und Matrixbestandteilen gesteuert [Spector et al 2001]. Hierbei sind Osteoblasten als Produzenten des potentesten Aktivators der Gefäßneubildung, vascular endothelial growth factor (VEGF), bekannt; der stärkste Stimulus für dessen Produktion ist Hypoxie [Steinbrech et al 1999, 2000]. Bei Frakturen liegt normalerweise eine saure Umgebung mit erhöhten Lactatwerten vor, die durch Gefäßrupturen und anaerobe Energiegewinnung hervorgerufen wird

[Chakkalakal et al 1994; Swenson & Claff 1946]. Sowohl die Azidität als auch die Lactatwerte beeinflussen die Bildung von VEGF, wie Spector et al zeigen konnten. Allerdings wird die VEGF-Produktion der Osteoblasten durch einen niedrigen pH-Wert und erhöhte Lactatwerte vermindert [Spector et al 2001]. Jensen et al zeigten jedoch, dass zum Beispiel Wund-Makrophagen auf eine solche Umgebung mit erhöhter Stimulation der Angiogenese reagieren [Jensen et al 1986].

Die Betrachtung der hier gewonnen Werte zeigt, dass der pH-Wert des Mediums während der gesamten Kulturdauer konstant zwischen 7,71 und 7,59 liegt, während der anfängliche gemeinsame Abfall in den Kulturen „nur Zellen“ und „Telos“ mit beginnenden Proliferations- und Differenzierungsvorgängen der enthaltenen Zellen vereinbar ist. Das weitere Abfallen der pH-Werte bei den „Telos“-Kulturen könnte auf eine weitere Proliferation der enthaltenen Zellen zurückzuführen sein, da diese auch das Trabekelnetz der enthaltenen Knochenproben besiedeln können und sich nicht nur auf dem Boden des Wells ausbreiten, wo nach einer bestimmten Zeit eine Selbstlimitation eintreten würde (wie bei „nur Zellen“ nach circa 22 Tagen in Kultur geschehen).

Bei den „autologen“ Kulturen zeigt sich ein konstant niedriger pH-Wert, was unter anderem mit den zusätzlich eingebrachten Zellen im autologen Probenkörper zu erklären ist. Die relative Kontinuität dieser Werte ließe sich mit einem ausgewogenem Verhältnis zwischen Zellneubildung und Zelltod, als auch Zellarbeitsvorgängen vereinbaren, da im eingebrachten Knochenkörper ja auch schon zu Beginn der Kultur bereits differenzierte Zellen arbeiten.

Die erhobenen Lactatwerte korrelieren in den Gruppen eng mit den pH-Werten. Bei der Auswertung finden sich zwei Kulturen, deren Lactatspiegel während der 12-wöchigen Kultur relativ konstant in je einem Bereich liegen, wobei sich diese Bereiche hochsignifikant voneinander unterscheiden. Bei der Kontrollkultur „nur Zellen“ sind die Lactatwerte im Medium stets vergleichsweise niedrig (5 – 12 mmol/ l), bei der autologen Kultur stets relativ hoch (31 – 39 mmol/ l). Interessant stellt sich der Verlauf der Lactatwerte bei der Kultur „Telos“ dar. Hier liegen die Werte während der ersten sieben Mediumwechsel stets sehr eng an denen der Kontrollkultur, eine Signifikanz lässt sich nicht nachweisen, während der Unterschied zur autologen Kultur hochsignifikant ist. Nach einem Anstieg der Lactatwerte zwischen Mediumwechsel acht, neun und zehn ist das Verhältnis genau umgedreht, ab dem elften Mediumwechsel lassen sich zwischen den Kulturen „autolog“ und „Telos“ keine signifikanten

Unterschiede mehr finden, während sich die Lactatwerte der Kultur „Telos“ hochsignifikant von denen der Kontrollkultur „nur Zellen“ unterscheiden.

Diese enge Korrelation der gemessenen pH-Werte und Lactatwerte gibt einen Hinweis auf das Wachstumsverhalten der jeweiligen Zellen und stimmt mit den lichtmikroskopischen Beobachtungen überein. Als mögliche variable Stressoren, die zu einem Anstieg der Lactatwerte bzw. dem stets hohen Lactatwert im Medium geführt haben, können steigende Zellanzahl und deren fortschreitende Differenzierung, mangelnder Platz und die Dauer des Versuchs gesehen werden. Aber auch die Füllhöhe und das Volumen des im Well enthaltenen Mediumüberstandes kann Einfluss auf den pH-Wert haben, da die Sauerstoffversorgung der Zellen mit zunehmender Diffusionsstrecke zum Wellboden schlechter wird. Die „soliden“ autologen Knochenplättchen verdrängten schon zu Beginn der Kultur am meisten Medium, während die Knochenplättchen der „Telos“ Kultur erst nach einigen Tagen gefüllt wurden.

Bei Betrachtung der pH- und Lactatwerte stellt sich in diesem Versuch eine stimulierende Umgebung für Osteoklasten dar, was mit der anfänglichen Resorption des eingebrachten Transplantats und somit startenden Remodelling-Prozessen vereinbar ist. Die im Verlauf abfallenden Lactatwerte können den Umschwung zu einem eher für Osteoblasten günstigen Milieu anzeigen, was aber auf Grund der Beendigung des Versuchs spekulativ bleibt und eventuell durch weitergehende Untersuchungen geklärt werden kann.

Kritisch muss angemerkt werden, dass der pH-Wert des Mediums stets unter den normalerweise in vivo vorliegenden Werten liegt, was bei erneuten Versuchsansätzen eventuell durch täglichen oder kontinuierlichen Mediumwechsel besser simuliert werden könnte. Park et al empfehlen zur ausreichenden Versorgung mit Nährstoffen ein rotierendes Kultursystem, wodurch auch mechanische Stimuli als weiterer Wachstumsreiz auf die Zellen einwirken [Park et al 2004].

IV.2.2 Zellzahlen

In dieser Studie wurden Zellen und Zelltrümmer während der Kultur im abgenommenen Medium zahlenmäßig bestimmt, eine Gesamtauszählung der im Well enthaltenen Zellen mit Bestimmung des Lebend-Tot-Verhältnisses war nur am Ende des Kulturzeitraumes möglich, da das Studiendesign den Verlust ganzer Wells während des Untersuchungszeitraumes nicht zuließ. Bereits in früheren Studien wurden aber über einen Beobachtungszeitraum von zwei Wochen stabile Zellzahlen mit etablierten Methoden nachgewiesen [Wilke et al 1998, 1999].

Im Vergleich der Verfahren untereinander und mit der Kontrollgruppe „nur Zellen“ lassen sich Unterschiede der im Mediumüberstand abgenommenen Zellen feststellen. Auffallend ist, dass sowohl bei der Kontrollkultur, als auch bei der Kultur „Telos“ zu Beginn des Kulturzeitraumes die meisten Zellen im abgenommenen Medium bestimmt werden und diese Zahlen anschließend kontinuierlich abfallen. Dies mag daran liegen, dass die Zellen zu Beginn der Kultur noch frei schwebend im Medium vorkommen, sich dann aber immer mehr am Wellboden anheften, bzw. die frei schwebenden Zellen nach einigen Mediumwechseln „abgeschöpft“ waren. Dies würde auch erklären, dass in der zweiten Hälfte der Kulturzeit vor allem als tot bewertete Zellen im Mediumüberstand vorkommen, während die lebenden Zellen weniger beim Mediumwechseln abgenommen werden. Ein konfluierender Zellrasen konnte auch in anderen Knochenmarkszellkulturen nach 2 bis 3 Wochen nachgewiesen werden [Ciapetti et al 2006].

Im Vergleich zur Kultur „Telos“ reduziert sich die Zahl mit dem Medium abgenommener Zellen bei der Kultur „nur Zellen“ schon nach dem ersten Mediumwechsel fast um die Hälfte. Dieser drastische Rückgang von Zellen im abgenommen Medium lässt sich bei der Kultur „Telos“ erst nach dem dritten Mediumwechsel beobachten. Eine Erklärung hierfür wäre das Loslösen von Zellen vom Wellboden durch Scherbewegungen der relativ leichten Knochenplättchen, die nach Ausbildung eines vollständigen Zellrasens immer mehr durch Zellbrücken, Pseudopodien und Matrixbildung an dem Wellboden verankert und schließlich auch untereinander verknüpft werden.

Die stets hohen Zellzahlen im Mediumüberstand der autologen Kultur im Vergleich zu den anderen Kulturen könnte wieder auf die zusätzlich im Knochen verbliebenen Zellen zurückgeführt werden, wodurch es den zugegebenen Zellen erschwert wird, in die

Knochenprobenkörper einzuwachsen, bzw. mehr Zellen im Well und somit im Medium vorhanden waren. Die im Vergleich zu den anderen Kulturen hohen und während der ersten 13 Mediumwechseln sogar ansteigenden Zahlen als tot gewerteter Zellen im Mediumüberstand könnten sowohl auf das Zugrundegehen von unterversorgten Zellen hinweisen, als auch die Apoptose der bei der Bearbeitung geschädigten Zellen wiedergeben. Diese Vermutung wird durch die lichtmikroskopische Beobachtung des leichten Rückgangs energiebedürftiger Fettzellen aus dem Trabekelwerk der autologen Knochenprobenkörper und den Vergleich der Proben nach Technovit-Einbettung untermauert.

Ein Peak zwischen 17 μm und 30 μm (als größere differenzierte Zellen oder Zellkonglomerate gewertet) entwickelt sich zuerst bei „nur Zellen“, erst später bei „Telos“, was auf eine im Vergleich verzögerte Entwicklung dieser Kultur hindeutet. Bei der autologen Kultur fehlt ein solcher Peak fast gänzlich, was wiederum durch erschwerte Versorgungsbedingungen erklärbar ist.

Insgesamt sind die im Mediumüberstand gemessenen Zellzahlen sicher auch vom Zellkultur-Handling des Betreuers abhängig.

IV.2.2.1 Trypanfärbung

Die Auszählung des Lebend-Tot-Verhältnisses nach Trypanblau-Färbung erfolgte nach Ablauf der 12 Wochen Zellkultur. Es sollten hier vor allem die mikroskopisch gewonnenen Einblicke in die herrschenden Bedingungen der Zellkultur bestätigt werden, um so die Enzym- und Interleukinmessungen besser einordnen zu können. Eine absolute Bestimmung der im Well enthaltenen Zellen war jedoch nicht möglich, da sich nicht alle Zellen aus dem Well lösen ließen.

Es zeigt sich ein besseres Abschneiden der Kontrollkulturen „nur Zellen“ im direkten Vergleich mit den mit Knochenprobenkörpern bestückten Kulturen über den gesamten Zeitraum von 12 Wochen. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass es bei den Kulturschalen mit Knochenstücken nicht möglich war, alle Zellen herauszulösen, da sie zu fest in den Probenkörpern verwachsen waren. Die ausgewerteten autologen Kulturen beinhalteten wiederum in Relation weniger als lebend gewertete Zellen als die ausgezählten „Telos“-Kulturen. Auch hier muss der Besiedlung der Knochenkörper Rechnung getragen werden, da in den autologen Knochenproben schon von Anfang an Zellen vorhanden waren, sie in die nach dem Telos-Verfahren behandelten Knochenstücke aber erst während der Kultur einwachsen mussten. Dadurch kommt es

zu Verzerrungen im Lebend-Tot-Verhältnis zwischen den verschiedenen Kulturen. Abschließend bleibt festzuhalten, dass das Lebend-Tot-Verhältnis bei allen drei Kulturen über den gesamten Zeitraum relativ konstant blieb und bei jeder Kultur über 50 % der ausgezählten Zellen als lebend zu bewerten sind.

IV.2.3 Enzyme

IV.2.3.1 Lactatdehydrogenase

Auf Grund des vorwiegend zytoplasmatischen Vorkommens der Lactatdehydrogenase wurde sie in unserem Versuch als Indikator für den Zelluntergang bestimmt.

Hierbei sind besonders die zu Beginn sehr hohen Werte bei der autologen Kultur auffällig, die im weiteren Verlauf kontinuierlich abfallen und sich bis auf wenige Ausnahmen hochsignifikant von den nachgewiesenen Mengen bei Kontroll- bzw. Telos-Kultur unterscheiden. Ein zu Beginn stark positiver Nachweis von Lactatdehydrogenase könnte zum einen für einen erhöhten Zelltod wegen der Säge- und Bohrvorgänge als auch der Nährstoffversorgung sprechen, zum anderen aber auch an toxischen Eigenschaften der eingebrachten Probenkörpern liegen. Da es sich bei den in dieser Kultur verwendeten Knochenplättchen jedoch um Material von Patienten handelt, deren Knochenmark verwendet wurde und die Plättchen stets unter absolut sterilen Bedingungen verarbeitet wurden, liegt die erstere Vermutung nahe. Diese Annahme deckt sich auch mit der bereits diskutierten Zellzahlentwicklung.

Die Telos-Kultur zeigt im Vergleich zur autologen Kultur eine langsam ansteigende Aktivität der Lactatdehydrogenase im Mediumüberstand mit stets hochsignifikanten Unterschieden zwischen diesen beiden Gruppen. Im Vergleich zu den relativ konstanten Lactatdehydrogenase-Werten im Mediumüberstand der Kultur „nur Zellen“ ergeben sich während der ersten drei Mediumwechsel keine signifikanten Unterschiede, ab dem sechsten Mediumwechsel sind die Unterschiede zwischen den gemessenen Werten auch hier hochsignifikant. Dieser langsame Anstieg der Lactatdehydrogenase wird vermutlich durch den erhöhten Zellumsatz nach anfänglicher Proliferationsphase ausgelöst, da durch das vermehrte Einwachsen der Zellen in die Knochenprobenkörper auch mehr Zellen auf natürliche Weise absterben. Eine Toxizität der nach dem Telos-Verfahren behandelten Knochenplättchen lässt sich mit den erhobenen Daten nicht

vereinbaren, was vor allem beim Vergleich der Messdaten mit Ergebnissen dieser Arbeitsgruppe bei gamma-bestrahlten Knochenkörpern deutlich wird.

Die recht konstanten Werte bei der Kultur „nur Zellen“ lässt sich mit einem stets gleich bleibenden Proliferations-/ Zelltodverhältnis schlüssig erklären. Auch hier korrelieren die Daten mit den lichtmikroskopischen Beobachtungen und den Zellzahlmessungen im Mediumüberstand.

Da der Zelltod wahrscheinlich hauptsächlich durch Nährstoffmangel, den Anfall von größeren Mengen saurer Metabolite und eventuell Sauerstoffmangel bedingt ist, könnte auch hier ein häufigerer Mediumwechsel Einfluss auf die Aktivitätswerte der Lactatdehydrogenase im Mediumüberstand haben. Bei der Situation *in vivo* werden diese Einflussgrößen durch den kontinuierlichen Blut- und Lymphfluss weitestgehend neutralisiert, so dass wahrscheinlich nur ein Tierversuch diese Daten vollständig objektivieren könnte.

IV.2.3.2 *Alkalische Phosphatase*

Um in dieser Studie nicht nur die immunologische Seite des Kontakts zwischen Knochenmark und Knochenprobenkörpern zu untersuchen, sondern auch Rückschlüsse auf eine eventuelle Osteoblastenaktivierung zu erhalten, wurde das Enzym Alkalische Phosphatase im Mediumüberstand bestimmt. Die alkalische Phosphatase ist ein entscheidender Faktor bei der Mineralisation und früher Marker für Knochenaufbau und Osteoblastenaktivität [Calvo et al 1996; Magnusson et al 1999]. So ist *in vitro* die erhöhte Aktivität der Alkalischen Phosphatase im Medium ein Hinweis auf ein vermehrtes Vorkommen von osteoblastären Zellen [Aubin et al 1995; Wozniak et al 2000].

Jedoch werden von Osteoblasten *in vitro* vorwiegend extrazelluläre Matrix und Fibronectin bei geringen Mengen alkalischer Phosphatase synthetisiert, deren Aktivität erst im Verlauf zunimmt und die Mineralisation initialisiert [Owen et al 1990].

In der hier vorliegenden Arbeit sind bei der Kontrollkultur „nur Zellen“ und der „Telos“-Kultur während des gesamten Versuchszeitraums keine signifikanten Mengen alkalischer Phosphatase und somit keine Zeichen von Mineralisation nachweisbar. Da nach Owen et al jedoch zu Beginn einer Zellkultur zuerst extrazelluläre Matrix und weniger alkalische Phosphatase gebildet wird, kann der Versuchszeitraum zu kurz gewählt sein, um die Phase der Mineralisation zu erreichen. Dieser Ansatz wurde bereits bei der Diskussion der pH-Werte angedacht. Extrazelluläre Matrix hat hierbei einen

entscheidenden Einfluss auf die weitere Differenzierung von Zellen, diese ist licht- und rasterelektronenmikroskopisch deutlich sichtbar [Stein & Lian 1993]. Jedoch ist der Übergang von der Proliferations- zur Differenzierungsphase in Vitro nur schwer zu erreichen [Strehl et al 2002]. Auch Ciapetti et al stellten bei ihren Studien mit Knochenmarkszellkulturen nur eine geringe Aktivität von Alkalischer Phosphatase fest, was auf eine stärkere Proliferation bei ausbleibender Differenzierung zurückgeführt wurde [Ciapetti et al 2006].

Bei der autologen Kultur fallen die anfänglich hohen Aktivitätswerte der alkalischen Phosphatase (278 U/ l) nach wenigen Mediumwechseln auf ebenso niedrige Werte ab, wobei zu den beiden anderen Gruppen noch signifikante Unterschiede bestehen. Diese hohe Aktivität zu Beginn der autologen Kultur ist ein Hinweis auf die hohe Zahl stoffwechselaktiver Zellen in den frisch gewonnenen Knochenplättchen. Der Abfall im weiteren Verlauf korreliert mit den anfänglich hohen Werten der Lactatdehydrogenase im Mediumüberstand, welche das Absterben auch dieser alkalische Phosphatase produzierenden Zellen wiedergeben könnte. Die stets etwas höheren Aktivitätswerte in der autologen Kultur können mit schon weiter fortgeschrittenen Knochenumbauprozessen durch die verbliebenen Osteoblasten erklärt werden.

Durch das eher saure Milieu in den mit Knochenplättchen versehenen Kulturen werden zudem Osteoklasten im Vergleich zu Osteoblasten bevorzugt.

IV.2.4 Zytokine

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die in dieser Studie verwendeten Wachstumsfaktoren keinen Einfluss auf die Zytokinausschüttung haben [Wilke et al 1998 – 2002].

Die wichtige Rolle von Interleukinen im Knochenstoffwechsel ist bekannt. So wurden unter anderem der Einfluss von Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-1 β (IL-1 β) und Tumornekrosefaktor- α (TNF α) auf Frakturheilung und Osteoklasten nachgewiesen [Kon et al 2001; Bertolini et al 1986; Canalis 1986, 1987; Flad & Gernsma 1997; Ishimi et al 1990; Jilka et al 1992; Suda et al 1995].

Bei Interleukinen wie IL-1 und TNF α zeigte sich ein Zusammenhang mit dem Rezeptor-Aktivator des Zellkernfaktors κ B (RANK) und seines Liganden (RANKL). Kong et al konnten den Stellenwert von RANKL bei der Vermittlung osteoklastogener

Vorgänge an RANKL-defizienten Mäusen aufzeigen, die Osteopetrose und eine fehlerhafte Zahnung ohne Osteoklasten zeigten, da die Osteoklastogenese nicht von Osteoblasten unterstützt wurde [Kong et al 1999]. Hierbei stellt das von Osteoblasten und Stromazellen exprimierte Osteoprotegerin (OPG) den natürlichen Gegenspieler von RANKL dar, indem es RANKL kompetitiv an der Bindung mit RANK hindert [Lacey et al 2000]. Mizuno et al konnten in diesem Zusammenhang an OPG-defizienten Mäusen schwere Osteoporose auf Grund der verstärkten Osteoklastenaktivität nachweisen [Mizuno et al 1998]. Hier stellt sich ein Ansatz für kommende Studien dar, indem man versucht, die Einflüsse von Knochentransplantaten nicht über die Interleukine zu erklären, sondern direkt die Aktivität von RANKL oder OPG bestimmt. IL-1 und TNF α bewirken über RANKL eine vermehrte Differenzierung von Osteoklasten [Yasuda et al 1998; Hofbauer et al 1999; O'Brien et al 1999]. Diese Reaktion auf TNF α wird zum einen durch ein Zusammenspiel des Transkriptionsfaktors nuclear factor κ B (NF κ B) und Aktivator-Protein-1 (AP-1) als auch via IL-6 vermittelt [Devlin et al 1998; Lam et al 2000; Gilbert et al 2000]. NF κ B hemmt sowohl die Differenzierung von Osteoblasten aus Vorläuferzellen, als auch die Bildung von Matrixproteinen in Osteoblasten und fördert die Produktion von Metalloproteinasen [Weitzmann & Pacifici 2005]. Auf diesem Wege wird das normalerweise im Körper vorliegende Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau von Knochen noch deutlicher zum Knochenverlust verschoben, was durch eine Hemmung der Osteoblastenentstehung durch TNF α noch weiter begünstigt wird [Nanes 2003]. Über eine vermehrte RANKL-Bildung wirkt auch IL-1 lebensverlängernd und aktivitätssteigernd auf Osteoklasten. So konnte auch in vitro gezeigt werden, dass eine Antagonisierung von IL-1 und TNF α zu einer reduzierten Knochenresorption führt [Kitazawa et al 1994].

Bezüglich der Rolle von Interferon- γ (IFN γ) im Knochenstoffwechsel herrscht Unklarheit. So zeigten unter anderem Takayanagi et al in vitro einen hemmenden Effekt von IFN γ auf Osteoklasten [Takayanagi et al 2000; Sato et al 1992]. Jedoch beschrieb Baker et al bei seinen Versuchen mit Mäusen auch einen Schutz vor infektiobedingtem Knochenabbau, wenn die IFN γ -Produktion unmöglich war [Baker et al 1999]. Zudem wurde in klinischen Studien keine Verminderung des Knochenabbaus bei rheumatoider Arthritis durch IFN γ -Gabe gefunden [Veys et al 1997]. Weitergehend konnte sogar ein positiver Effekt von IFN γ bei der Behandlung von Patienten mit Osteopetrose aufgezeigt werden [Key et al 1995]. Keine wichtige Rolle am infektiinduzierten Knochenabbau werden IFN γ hingegen von Sasaki et al auf Grund der Studien an IFN γ -

Knockout-Mäusen zugeschrieben [Sasaki et al 2004]. Eine Erklärung der gegensätzlichen Effekte in vitro bzw. in vivo kann durch Betrachtung der Wirkung versucht werden. So hemmt IFN γ zum einen die Osteoklasten direkt, was vor allem in vitro zum Tragen kommt, aktiviert zum anderen aber auch T-Zellen, was wiederum zu einer vermehrten Aktivität von Osteoklasten führt. Dieser Effekt führt in vivo dann zu den knochenresorptiven Effekten von IFN γ [Weitzmann & Pacifici 2005; Gao et al 2007]. Diese Erklärung wird durch den Nachweis einer fehlenden Hemmung der Osteoklastendifferenzierung durch IFN γ in Kulturen mit hohen RANKL-Werten bestätigt [Huang et al 2003].

Einen osteoklastogenen Effekt von IL-6 konnten bereits viele Arbeitsgruppen in vitro aber auch in vivo nachweisen [Kurihara et al 1990; Kotake et al 1996; Naka et al 2002; Wong et al 2003; Sasai et al 1999]. Auch in Knochenmarks-Zellkulturen konnte dieser osteoklastogene Effekt, eine vermehrte Knochenresorption und ein beschleunigter Knochenumbau durch IL-6 bestätigt werden [Girasole et al 1994; Heymann & Rouselle 2000, Rozen et al 2000]. Wobei Roodman et al einen koloniestimulierenden Effekt auf frühe Osteoklasten-Vorläuferzellen in Langzeit-Knochenmarks-Zellkulturen beschrieben [Roodman 1992, 2006]. IL-6 führt hierbei sowohl in Knochenmarkszellkulturen als auch bei humanen Osteoblasten zu keiner Expression von RANKL, sondern stimuliert die Osteoklastenreife auch ohne dessen Vermittlung [Han et al 2001; Hofbauer et al 2000; Kudo et al 2003]. Die Wirkung von IL-6 wird durch ein Rezeptorsystem vermittelt, das aus einem 80kD-Rezeptor und einem Signaltransmitter (gp130) besteht [Ernst & Jenkins 2004]. Der 80kD-Rezeptor liegt sowohl transmembranös als auch löslich vor. Der lösliche 80kD-Rezeptor kann seine Wirkung auch an Zellen entwickeln, die nur den gp130-Rezeptor haben, was „Trans-signaling“ genannt wird [Kishimoto 2006]. Dieser lösliche IL-6-Rezeptor (sIL-6R) übermittelt viele der IL-6 Effekte, z. B. die Osteoklastenbildung und die Proliferation synovialer Fibroblasten, und lässt sich unter entzündlichen Bedingungen vermehrt nachweisen [Flannery et al 2000; Kotake et al 1996; Jones et al 2001].

Im Gegensatz zu diesen osteoklastogenen Eigenschaften von IL-6 beschrieb Fuller et al keinen Effekt von IL-6 auf die Knochenresorption [Fuller et al 2006]. Auch zeigten in vivo Studien an IL-6-Knockout-Mäusen keinen spezifischen Knochentypus [Palmqvist et al 2002; Kopf et al 1994]. Wobei Balto et al bei Versuchen mit IL-6-Knockout-Mäusen und nach Neutralisation von endogenem IL-6 mit entsprechenden Antikörpern eine verstärkte infektiobedingte Knochenresorption beobachteten [Balto et al 2001]. Sims

et al zeigten sogar eine unterstützende Wirkung von IL-6 auf Osteoblasten und eine verstärkte osteoblastäre Antwort in Mäusen [Sims et al 2004]. Was Studien von Cho et al belegen, bei denen hemmende Einflüsse von IL-6 auf die Proliferation primitiver Mesenchymzellen, aber ein positiver Effekt auf die Differenzierung reifer Osteoblasten gefunden wurden [Cho et al 2007]. Weiterhin zeigen neuere Studien die verbesserte Frakturheilung bei Gabe von Parathormon und IL-6 als Beschleuniger des Knochenumbaus durch Stimulation von Chondro- und Osteoklasten [Rozen et al 2007; Franchimont et al 2005].

Auch die traditionelle Ansicht, dass IL-6 in Entzündungsreaktionen pro-inflammatorisch wirkt, wird in letzter Zeit hinterfragt; so stellten unter anderem Ramsay et al anti-inflammatorische Eigenschaften und Schindler et al eine Hemmung der Produktion von IL-1 und TNF α durch IL-6 fest [Ramsay et al 1994; Akira et al 1993; Tilg et al 1991; Schindler et al 1990]. Dies wird durch Beobachtungen einer verstärkten Entzündungsreaktion und TNF α -Produktion nach Infektion oder LPS-Gabe bei IL-6-defizienten Mäusen untermauert [Fattori et al 1994; Balto et al 2001].

IV.2.4.1 Interleukin-1 β (IL-1 β)

Im Verhalten hinsichtlich der Ausschüttung von Interleukin-1 β verhalten sich die Kulturen „nur Zellen“ und „Telos“ sehr ähnlich. Beide zeigen ein Maximum am ersten Mediumwechsel („nur Zellen“: 151,2 pg/ ml, „Telos“: 156,2 pg/ ml), wonach die Werte um den Nullwert liegen. Es lassen sich auch keine signifikanten Unterschiede der Mittelwerte nachweisen. Die erhöhten Werte während der ersten Tage in Kultur können als Indikator für eine Stressreaktion der zugegebenen Zellen auf die neuen Bedingungen angesehen werden. Diese Interpretation wird auch durch das Abfallen der gemessenen IL-1 β -Konzentrationen untermauert. Wichtig ist, dass die Werte bei der Kultur „Telos“ nicht höher lagen als bei der Kultur „nur Zellen“. Dies zeigt, dass die Knochenmarkszellen in der Kultur „Telos“ das gleiche Maß an Stress erfahren haben wie die Zellen der Nullprobe und somit die nach dem Telos-Verfahren behandelten Knochenplättchen keine weitere Noxe darstellten. Der mögliche Einwand, dass durch maximale Stimulation aller zugegebenen Zellen zu Beginn eine eventuell stärkere Stresssituation durch Noxen unentdeckt bleibt, wird durch das gleichförmige Abfallen der Werte beider Kulturen im Verlauf widerlegt.

Anders verhält es sich bei der Zellkultur „autolog“, die mit einem Wert von 6.144,1 pg/ ml IL-1 β im Mediumüberstand am ersten Mediumwechsel den Mittelwert der

Kontrollkultur circa 40fach übertrifft. Dieser fällt danach langsamer ab als bei beiden anderen Kulturen. Die ermittelten Mittelwerte der IL-1 β -Konzentration im Mediumüberstand der autologen Zellkultur unterscheiden sich bis zum 14. Mediumwechsel stets zumindest „signifikant“ von den Kulturen „nur Zellen“ und „Telos“. Auch diese Konstellation zeigt die zu Beginn der Zellkulturen stehende Stressreaktion nach der Präparation der Zellen, die sich im Verlauf abschwächt. Die viel höheren IL-1 β -Werte lassen sich mit der großen Anzahl der im Knochenplättchen befindlichen Zellen erklären, die durch das vorherige Bearbeiten (Sägen und Bohren) auch einer immensen Stresssituation ausgesetzt waren und daher IL-1 β sezernieren. Außerdem kann auch schon vor der Bearbeitung IL-1 β in den Knochenstücken vorhanden sein, da diese nicht speziell gereinigt wurden. Der Abfall der Konzentrationen im weiteren Verlauf der Kultur zeigt, dass auch hier keine weiteren Noxen in der Kultur vorhanden waren.

Dass die abfallenden Werte in allen drei Kulturen durch einen selektiven Untergang der Monozyten, die hauptsächlich IL-1 β synthetisieren, hervorgerufen werden, ist unwahrscheinlich. Es könnte jedoch zu einer Suppression der IL-1 β -Synthese durch die hohen Mengen von IL-6 gekommen sein.

Die Annahme einer durch IL-1 β verstärkten Osteoklastogenese oder Aktivität von bereits vorhandenen Osteoklasten bei den untersuchten Transplantatformen lässt sich durch die Ergebnisse dieser Studie nicht begründen.

IV.2.4.2 Interleukin-6 (IL-6)

Alle in der humanen Knochenmarkszellkultur vorherrschenden Zellarten produzieren und sezernieren IL-6, weshalb verständlich ist, dass IL-6 das in den untersuchten Kulturen am stärksten freigesetzte Interleukin war.

Wie schon bei IL-1 β verhalten sich auch bei IL-6 die Kulturen „Telos“ und „nur Zellen“ in ihrem Verlauf sehr ähnlich. Bei beiden fallen die IL-6-Konzentrationen anfänglich ab (bis zum 4. Mediumwechsel) und steigen dann wieder an, bis eine Plateauphase erreicht wird. Die IL-6 Mengen bei der „Telos“-Kultur liegen hier meist etwas höher als bei der Kultur „nur Zellen“; signifikante Unterschiede können aber nicht festgestellt werden. Auch auf Grund dieser Daten ist von einer guten Verträglichkeit des eingebrachten Knochenmaterials auszugehen. Der erste Peak der IL-6 Konzentrationen wird durch die belastenden Umstände zu Beginn der Zellkultur ausgelöst. So zeigt auch ein Versuch an Ratten, dass IL-6 nach Eingriff am Knochen hochreguliert wurde und nach Rückkehr zu

Normalwerten wieder anstieg [Cho et al 2007]. Der Anstieg im Verlauf ist dann durch Zelldifferenzierung und Aufbau einer spezifischen Zellpopulation bedingt, die in der Lage ist, dieses Interleukin kontinuierlich zu produzieren.

Bei der autologen Kultur hingegen liegen die gemessenen IL-6 Konzentrationen im Mediumüberstand am Anfang 200fach über denen der Kontrollkultur, wonach sie kontinuierlich abfallen. Hier ist die wahrscheinlichste Begründung in den bereits im Plättchen vorhandenen IL-6-Mengen und der weit größeren Zellzahl zu finden.

Da neuere Studien auch anti-inflammatorische Effekte und weiterhin sogar einen positiven Einfluss auf Frakturheilung und Knochenumbau von IL-6 aufgezeigt haben, ist davon auszugehen, dass im Rahmen einer Knochentransplantation IL-6 durchaus für ein günstiges Milieu sorgt. Größere Mengen IL-6 im Medium wären daher besser mit dem guten Einwachsen des Transplantats vereinbar als zu niedrige. Diese Erkenntnisse sind gut mit den hohen IL-6 Werte bei der autologen Kultur vereinbar. Nun liegen die IL-6-Konzentrationen im Mediumüberstand der „Telos“-Kulturen stets ungefähr auf dem Niveau der Kontrollkultur, so dass man lediglich sagen kann, dass dieses Verfahren keine toxischen Eigenschaften zu haben scheint. Die Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe bei anderen Desinfektions- und Sterilisationsverfahren zeigen aber auch niedrigere IL-6-Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe, was gute Eigenschaften der nach dem Telos-Verfahren behandelten Knochenkörper bezüglich des Einwachsverhaltens annehmen lässt.

IV.2.4.3 Tumornekrosefaktor- α (TNF α)

TNF α ist das dominierende Zytokin der inflammatorischen Osteolyse und wurde als Marker des osteoklastischen Knochenabbaus bestimmt. Bei allen drei Gruppen wurde TNF α nur im Überstand des ersten Mediumwechsels nachgewiesen. Hierbei liegt die autologe Kultur mit den höchsten Werten vor der „Telos“-Kultur und diese vor der Kontrollkultur „nur Zellen“. Auf Grund der hohen Standardabweichung ist diese Reihenfolge aber nicht sicher festzustellen.

Da TNF α während der 12-wöchigen Zellkultur nicht mehr nachweisbar ist, besteht kein Anhalt für eine inflammatorische Knochendestruktion. Gemäß diesen Daten haben alle der untersuchten Verfahren keine entzündungsförderlichen Eigenschaften. Diese Annahme wird durch Studien mit dem gleichen Zellkulturmodell gestützt, bei denen es zu einem Anstieg der TNF α -Konzentration im Mediumüberstand im Sinne einer

Fremdkörperreaktion kam [Wilke et al 2002]. Ein weiterer Erklärungsansatz der niedrigen TNF α -Werte ist die Produktionshemmung durch IL-6.

IV.2.4.4 Interferon- γ (IFN γ)

In dieser Studie konnte IFN γ nur im Mediumüberstand der autologen Kultur nachgewiesen werden und auch dort nur in sehr geringen Mengen. Jedoch bestehen stets signifikante Unterschiede zu den beiden anderen Kulturen. IFN γ wird in vitro ein osteoklastenhemmender Effekt zugeschrieben; da in dieser Studie aber auch T-Lymphozyten in der Zellkultur enthalten waren, ist auch eine Förderung der Osteoklastenaktivität möglich. Da sich IFN γ in der autologen Kultur nachweisen lässt, sollte man auch bei anderen Materialien mit möglichst guten Eigenschaften als Transplantat einen solchen Nachweis erwarten. Dies ist hier nicht der Fall. Der fehlende Interferon-Nachweis bei der „Telos“-Kultur allein betrachtet liefert somit keinen Anhalt für eine besonders gute Transplantateinheilung.

IV.2.5 Mikroskopie

Die nach 12-wöchiger Zellkultur erstellten rasterelektronischen Bilder zeigen bei allen Kulturen typische spindelförmige Zellen auf der Knochenoberfläche, die auch gut in die spongiöse Struktur einwachsen. Besonders bei der autologen Kultur zeigt sich eine Einscheidung der Knochenprobenkörper in homogen verteilte, spindelförmige Zellen und extrazelluläre Matrix, während im Knochenkörper selbst ein Rückgang der vorhandenen Zellen im Vergleich zur Nullprobe zu erkennen ist.

Eine quantitative Auswertung der rasterelektronischen Bilder war nicht Ziel dieser Arbeit und erfolgte wegen der benötigten Bildmenge nicht. Die gewünschten Aussagen über die Ausbildung extrazellulärer Matrix können auch mit den angefertigten Bildern getroffen werden.

Mikrofrakturen und andere morphologische Veränderungen der Knochenmatrix durch die angewandten Desinfektions- und Bearbeitungsschritte sind bei den hier verwendeten Verfahren nicht zu erkennen. Diese Beobachtungen decken sich mit früheren Studien zu dieser Fragestellung [Kyoto Universität 1991, 2001; Voggenreiter et al 1994].

Die rasterelektronenmikroskopischen Beobachtungen korrelieren mit den Schnittbildern durch die Knochenprobenkörper zu Beginn und am Ende der Zellkultur. Hierbei zeigt

sich bei den autologen Knochenplättchen eine Abnahme der im Knochen vorhandenen Zellen während der Zellkultur, wobei sich aber auch nach 12 Wochen Zellkultur noch Zellen nachweisen lassen. Auch die starke Einscheidung der Plättchen, die am Plättchenboden etwas geringer ausgeprägt ist als an den anderen Flächen, ist gut zu beobachten.

Bei den nach dem Telos-Verfahren behandelten Knochenblöcken (Null-Proben) ist die Spongiosa in den von uns angefertigten Schnitten frei von Zellen und auch die in der Knochenmatrix eingebauten Osteoblasten scheinen avital zu sein. Nach 12 Wochen Zellkultur zeigen sich Zellen, die in das Probenstück eingewachsen sind und sich an die Trabekel angelagert haben oder sich zwischen diesen aufspannen. Auch andere Studien bestätigen das gute Einwachsverhalten bei 80°C-desinfizierten allogenen Knochentransplantaten [Hofmann et al 2005]. In der Peripherie zeigen sich deutlich mehr Zellen als im Zentrum des Knochenplättchens. Die meisten Zellen scheiden das Plättchen ein.

IV.3 Zusammenschau mit anderen Studien

Nutzt man hohe Temperaturen zur Desinfektion von Knochentransplantaten zeigt sich eine gute Keimelimination bei negativen Konsequenzen hinsichtlich der biomechanischen und osteointegrativen Eigenschaften. Kommen dagegen niedrige Temperaturen (z. B. 60°C) zum Einsatz, besteht ein höheres Infektionsrisiko bei geringer Alteration der biomechanischen und osteointegrativen Merkmale [Kühne et al 1994]. Die 80°C- Thermodesinfektion stellt einen Lösungsweg dieser Problematik dar. Es gibt allerdings kaum Aussagen über die Biokompatibilität, während sich die meisten Studien mit den biomechanischen Eigenschaften der wärmebehandelten Knochentransplantate beschäftigen.

Bereits in früheren Arbeiten zeigte sich, dass die biomechanischen Veränderungen des Transplantats nach 80°C- Wärmebehandlung mit einem Festigkeitsverlust von 10 – 15 % nicht gravierend sind [Knaepler et al 1991; Garrel & Gotzen 1998]. Auch die osteokonduktiven und osteoinduktiven Eigenschaften werden durch eine Desinfektion mit 80°C nicht oder kaum gemindert. So konnte gezeigt werden, dass die nach diesem Verfahren behandelten Transplantate noch 50 – 80 % ihrer osteoinduktiven Kapazität

besaßen [Hilfenhaus et al 1990; Ooura et al 1990]. In einer in vitro-Studie stellten Hofmann et al eine verlangsamte Adhäsion der Zellen an die mit 80°C behandelten Knochenprobenkörper als Zeichen einer Minderung der Osteokonduktivität fest [Hofmann et al 2000]. Hier muss jedoch beachtet werden, dass nur Osteoblasten verwendet wurden, was eine Übertragbarkeit auf unseren Versuchsansatz einschränkt. Außerdem zeigte die 80°C-Gruppe auch in diesem Versuch bessere Adhäsionseigenschaften als das andere dort getestete rein thermische Verfahren: Autoklavierung. Eine verminderte Adhäsion der Knochenmarkszellen an 80°C-behandelten Knochenprobenkörpern im Vergleich zu anders behandelten Knochenstücken kann in unserer Arbeitsgruppe nicht festgestellt werden.

Des Weiteren zeigte der 80°C- thermodesinfizierte Knochen unter anderem im Tierversuch ein deutlich besseres Einwachsverhalten als autoklavierter Knochen [Knaepler et al 1992b, 1994a]. Dieser gute Einbau konnte in einer prospektiven klinischen Studie bestätigt werden, wobei die ermittelte Komplikationsrate der Vergleichsgruppe (unbehandelten allogenen Knochentransplantation) annähernd glich [Shimizu et al 1999]. Im Rahmen ihrer Studie zeigten Shimizu et al auch, dass bei wärmebehandelten Knochentransplantaten die Revaskularisierung und Bildung neuen Knochens mit steigender Temperatur nachlässt, jedoch eine Behandlung mit 80°C noch keinen deutlich negativen Einfluss hat, sondern vielmehr den guten Ergebnissen bei 60°C- Behandlung gleicht [Shimizu et al 1999]. Diese Ergebnisse werden durch unsere Daten gestützt. So liegt nach unserer Analyse bei den 80°C-behandelten Knochenproben eine gute Biokompatibilität vor, wodurch ein guter Einbau in das Transplantatlager beim Empfänger ermöglicht wird.

Die Desinfektion mit 60°C ist im Vergleich zur 80°C- Wärmebehandlung besser untersucht worden. Da sich die Ergebnisse in vergleichenden Studien sehr ähneln, werden im Folgenden auch einige 60°C- Studien berücksichtigt. So zeigten auch Shin et al im Tierversuch, dass die biomechanischen Eigenschaften von 60°C-wärmebehandelte Knochenproben kältekonservierten Proben gleich kamen, während eine Behandlung mit 100°C eine deutliche Abnahme der Belastbarkeit zeigte [Shin et al 2005]. Hinsichtlich des Einwachsverhaltens, der Zellinfiltration und der Osteoblastendifferenzierung zeigten Tierversuche von Zoricic et al ein deutlich besseres Ergebnis bei pasteurisierten (56°C) im Vergleich zu autoklavierten (120°C) Knochenstücken [Zoricic et al 2002]. Pasteurisierten Knochenstücke waren bezüglich der Osteointegration den kältekonservierten Knochenstücken ebenbürtig, wie es bereits frühere Studien gezeigt

haben [Kühne et al 1992, 1994]. Man kann also davon ausgehen, dass das in unserer Studie verwendete 80°C- Wärmeverfahren den autoklavierten Proben hinsichtlich des Einwachsverhaltens überlegen ist.

Ein Beleg für unsere Ergebnisse findet sich auch in einer Studie zur Vitalität einer humanen Knochenmarks-Zellkultur von Hofmann et al. Hier zeigte sich die höchste Zahl vitaler Zellen nach Aussaat auf 80°C-behandelten Knochenprobenkörpern mit signifikant besseren Werten im Vergleich zu gamma-sterilisierten und autoklavierten Knochenstücken [Hofmann et al 2005]. Weiterhin zeigten sie in der 80°C-Gruppe die höchste Expression von Osteocalcin, wobei Osteocalcin ein spezifischer Marker für Zellen der Osteoblasten-Zelllinie ist [Yao et al 1994]. Allerdings zeigten Hofmann et al auch eine erhöhte AP-Aktivität in der 80°C-Gruppe auf, was durch unsere Studie nicht belegt werden kann.

Andere Autoren lehnen die 80°C- Wärmebehandlung zur Knochentransplantatdesinfektion wegen vermeintlicher Infektionsrisiken ab [Schratt et al 1996a]. Von einer verzögerten Durchbauung und geringeren biologischen Wertigkeit 80°C-wärmebehandelter Transplantate im Vergleich zu unbehandelten Knochenpräparaten berichteten Stützle et al als Ergebnis eines Großtierversuchs am Schaf [Stützle et al 1995]. Dies ist jedoch vor dem Hintergrund zu betrachten, dass die Transplantation unbehandelter Knochenstücke bei dem bekannten Infektionsrisiko obsolet ist. Hier muss man sich für das geringste Übel entscheiden.

IV.4 Standardisierbarkeit

Um eine hohe Standardisierbarkeit unserer Studie zu gewährleisten, wurden an die Spender der Hüftköpfe und der Knochenmarkszellen die gleichen Anforderungen gestellt. Sie sollten in einem Alter zwischen 40 und 80 Jahren sein, der 82-jährige Patient wurde auf Grund seiner guten körperlichen Verfassung nach Rücksprache in die Studie aufgenommen.

Die Genehmigung dieser Studie durch die Ethikkommission des Fachbereiches Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg (AZ 66/03) war bindend.

Auffällige Vorerkrankungen außer Coxarthrose in der Anamnese des Patienten waren weitere Ausschlussgründe aus der Studie. Eine serologische Untersuchung der Patienten

erfolgte im Rahmen einer präoperativen Eigenblutspende und gemäß den Anforderungen, die durch die hiesige Knochenbank an ihre Spender gestellt wurden. Durch die strenge Auswahl der Spender für diese Studie wurde gewährleistet, dass die Zellkultur im Rahmen einer gewissen Streubreite verlässliche Ergebnisse ermöglicht, die auch in weiteren Studien mit vergleichbaren Patientenkollektiven gut reproduzierbar sind. Dies wird durch frühere Studien mit einer humanen Knochenmarkszellkultur unterstrichen. Diese zeigten bei gleicher Art der Zellgewinnung und Kultivierung stets reproduzierbare Ergebnisse [Wilke et al 1992, 1998, 1999, 2002].

IV.5 Resümee

Ziel unserer Versuche war die Darstellung von Veränderungen in einer Knochenmarkszellkultur, die durch Sterilisations- und Desinfektionsverfahren allogener Knochentransplantate im Vergleich zu einem autologen Versuchsansatz in vitro entstehen. Die verwendete humane Knochenmarkszellkultur stellt hierbei die beste Nachbildung der physiologischen Situation in vivo dar, da es sich um humane Zellen handelt, die direkt mit den Knochentransplantaten in Kontakt kommen. Außerdem wurde eine Primärkultur verwendet, so dass mögliche Fehlerquellen wie eine Prozessierung der kultivierten Zellen ausgeschlossen werden können.

Wie schon in früheren Studien festgestellt wurde, bietet das Telos-Verfahren eine gute Lösung der infektiösen Risiken, die durch ein allogenes Transplantat entstehen [Garrel et al 1997; Knaepler et al 1994a; Pruss et al 2003a, 2003b]. Auch die biomechanischen Eigenschaften der so behandelten Transplantate sind im Vergleich zu anderen Verfahren als positiv zu werten [Garrel & Gotzen 1998]. Zudem zeigten Versuche zum Einwachsverhalten von Knochentransplantaten keine Beeinträchtigung der Osseointegration und der Revaskularisierung nach der Desinfektion mit 80°C [Knaepler et al 1994a; Shimizu et al 1999]. Des Weiteren stellt die Desinfektion nach dem Telos-Verfahren eine vergleichsweise kostengünstige Möglichkeit der Transplantatvorbereitung dar [Garrel & Gotzen 1998].

Diese Studie zeigt, dass die Behandlung von allogenen Knochentransplantaten nach dem Telos-Verfahren keine toxischen Veränderungen bedingt. Auch sind die erhaltenen

Daten über die Zytokinausschüttung gut mit einer hohen Biokompatibilität zu vereinbaren.

Unter Berücksichtigung der vorhergehenden Studien und der in unserer Studie gewonnenen Einblicke in die Immunomodulation, scheint die 80°C-Desinfektion ein gutes Verfahren zur Desinfektion allogener Knochentransplantate zu sein.

Zur weiteren Untersuchung von sterilisierten oder desinfizierten Knochentransplantaten werden jedoch Tierversuche unumgänglich sein, da z. B. ein Belastungstest und weitere physikochemische Wechselwirkungen in vitro nur unzureichend erforscht werden können. Um eine noch bessere Simulation der in vivo Bedingungen mit Hilfe der Zellkultur zu erreichen, ist eine kontinuierliche Mediumversorgung mittels Durchflusszellkultur oder ein rotierender Zellkulturaufbau anzudenken.

V. Zusammenfassung

Fragestellung

Ziel dieser Studie war die Untersuchung, inwieweit Desinfektions- und Sterilisationsverfahren die Zytokinfreisetzung einer humanen Knochenmarkszellkultur modulieren, um so Rückschlüsse auf die Biokompatibilität verschieden bearbeiteter allogener Transplantate ziehen zu können.

Daher wurde die Ausschüttung von IL-6, IL-1 β , TNF α und IFN γ über einen Beobachtungszeitraum von 12 Wochen kontrolliert. In diesem Zeitraum wurden pH-Wert, Zellzahlen, Lactat, alkalischer Phosphatase und LDH bestimmt. Zusätzlich wurden lichtmikroskopische und rasterelektronenmikroskopische Bilder angefertigt.

Material und Methoden

Das Zytokin-, Enzymprofil, der pH-Wert und die Zellzahlentwicklung im Mediumüberstand wurden anhand einer standardisierten humanen Knochenmarkszellkultur nach Knochenprobenzugabe untersucht.

Die verwendeten Knochenplättchen und die Knochenmarkszellen wurden im Rahmen der primären Operation für eine totale Hüftgelenksendoprothese steril gewonnen und anschließend aufgearbeitet. Eine Genehmigung durch die Ethikkommission des Fachbereiches Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg lag vor: AZ 66/03. Aus dem Hüftkopf wurden Knochenplättchen steril gefertigt. Anschließend folgte die Behandlung nach dem Telos-Verfahren oder die Probenkörper fanden für die autologe Kultur nativ Verwendung. Die Knochenmarkszellen wurden aus einem markhaltigen Block des distalen Femur gewonnen. Es wurden 3×10^6 Zellen pro Well mit 3ml IMDM-Medium auf den Knochenprobenkörpern ausgesät und über 84 Tage kultiviert. Zur Kontrolle wurde eine Kultur ohne Knochenplättchen und eine Negativkontrolle ohne Zellen mitgeführt.

Ab dem zweiten Mediumwechsel erfolgte der Zusatz von IL-3 und GM-CSF (10ng/ ml Medium) als Wachstumsfaktoren. Mediumwechsel fanden alle 48 Stunden statt. Die Überstände der Mediumwechsel 1 – 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42 wurden gesammelt und jeweils das Zytokin- und Enzymprofil bestimmt. Zudem erfolgte bei jedem Mediumwechsel eine pH-Wert- und Zellzahlbestimmung im Mediumüberstand.

Ergebnisse

Der pH-Wert fällt bei allen Kulturen im Verlauf ab; nur bei der autologen Kultur liegt er auch zu Beginn bei sehr niedrigen Werten. Insgesamt lässt sich bei allen Gruppen ein Rückgang der im Mediumüberstand enthaltenen Zellen darstellen, wobei sich die Verteilung der Zellen in Richtung avitaler Zellen verschiebt.

IL-6 lässt sich zu Beginn bei allen Kulturen im Medium nachweisen. Bei der autologen Gruppe fallen die IL-6 Werte im Verlauf der Kultur kontinuierlich ab, sind aber stets höher als bei den anderen Gruppen. Bei den Kulturen „nur Zellen“ und „Telos“ steigen sie ab dem 4. Mediumwechsel wieder an und erreichen ein Plateau. IL-1 β und TNF α lässt sich bei allen Kulturen mit Zellen nur ganz zu Beginn nachweisen. IFN γ wird nur von Zellen der autologen Kultur freigesetzt, es fällt zu Beginn leicht ab und steigt ab dem 8. Mediumwechsel auf ein Plateau an.

Der Nachweis von Lactat gelang bei allen Kulturen mit Zellen. Die autologe Kultur zeigt konstant hohe Lactat-Werte im Beobachtungszeitraum, während der Lactatspiegel bei den anderen Kulturen ansteigt. LDH fällt bei der autologen Kultur nach anfänglich hohen Werten ab, bei „Telos“ steigen die LDH-Werte im Kulturzeitraum an, während sie bei „nur Zellen“ auf einem konstanten Niveau bleiben. Alkalische Phosphatase ist nur bei der autologen Kultur zu Beginn nachweisbar.

Mikroskopisch kann die rasche Ausbildung eines Zellrasens in den ersten zwei Wochen beobachtet werden. Weiterhin dringen die ausgesäten Zellen in die Knochenkörper ein und umschließen sie mit extrazellulärer Matrix.

Diskussion

Die Studie zeigt, dass unterschiedliche Desinfektions- und Sterilisationsverfahren von Knochentransplantaten Einfluss auf die Zytokinfreisetzung von humanen Knochenmarkszellen in einer Kultur haben.

Weiterhin wird in dieser Studie mit Hilfe einer autologen Kultur der Gold-Standard einer Knochentransplantation untersucht. Dabei stellt der Versuchsaufbau eine gute Simulation der in vivo Situation dar. Es zeigt sich hierbei deutlich, dass die Immunantwort eine physiologische Reaktion auch auf autologe Transplantate ist. Die Ausschüttung von osteoklastogenen Zytokinen scheint eine elementare Rolle beim Um- und Einbau des Transplantats zu haben.

Anderen Studien über biomechanische Eigenschaften und Einwachsverhalten und den Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe zufolge scheint das Telos-Verfahren ein günstiges Verfahren zur Behandlung von allogenen Knochentransplantaten zu sein.

VI. Literaturverzeichnis

Aaboe M, Pinholt EM, Hjorting-Hansen E (1995),
Healing of experimentally created defects: a review.
Brit J Oral Maxillofac Surg 33: 312 – 31.

Akira S, Taga T, Kishimoto T (1993),
Interleukin-6 in biology and medicine.
Adv. Immunol. 54: 1 – 78.

Aubin JE, Liu F, Malaval L, Gupta AK (1995),
Osteoblast and chondroblast differentiation.
Bone, 17(2 Suppl): 77 – 83.

Azuma Y, Kaji K, Katogi R, Takeshita S, Kudo A (2000),
Tumor necrosis factor- α induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts.
J Biol Chem 275: 4858 – 4864.

Bätge B, Seitzer U, Müller PK (1997),
Die organische Knochenmatrix. Kollagene und nichtkollagene Proteine.
Osteologie 2: 193 – 201.

Baker PJ, Dixon M, Evans RT, Dufour L, Johnson E, Roopenian DC (1999),
CD4(+) T cells and the proinflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-6
contribute to alveolar bone loss in mice.
Infect Immun 67: 2804 – 2809.

Balto K, Sasaki H, Stashenko P (2001),
Interleukin-6 Deficiency Increases Inflammatory Bone Destruction.
Infection and Immunity Vol. 69(2) 744 – 750.

Barth A (1893),

Über histologische Befunde nach Knochenimplantationen.

Arch Klin Chir 46: 409.

Bauer TW, Muschler GF (2000),

Bone graft materials. An overview of the basic science.

Clin Orthop 371: 10 – 27.

Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD, Mundy GR (1986),

Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumor necrosis factors.

Nature 319: 516 – 518.

Böcker W, Denk H, Dietz PU (2001),

Entzündung.

In: Böcker W, Denk H, Dietz PU (eds), Pathologie, 69 – 100,

Urban & Fischer München Jena.

Bolander M, Balian G (1986),

The use of demineralized bone matrix in the repair of segmental defects. Augmentation with extracted matrix proteins and a comparison with autologous grafts.

J Bone Joint Surg 68: 1264 – 1274.

Bosworth DM (1955),

Repair of herniae through iliac-crest defects.

J Bone Joint Surg Am 37: 1069.

Boyce T, Edwards J, Scarborough N (1999),

Allograft bone. The influence of processing on safety and performance.

Orthop Clin North Am 30(4): 571 – 578.

Bright RW, Smarsh JD, Gambill VM (1987),

Sterilisation of human bone by irradiation.

In: Friedländer GE et al (eds) Osteochondral allografts, biology, banking and clinical applications, 223 – 232,

Boston, Toronto, Little Brown.

Buckwalter J, Glimcher M, Cooper R, Recker R (1995),

Bone biology. PartII: formation, modeling, remodeling, and regulation of cell function.

J Bone Joint Surg 77:1276 – 1289.

Burchart H (1996),

Current Concepts in Bone Grafting.

In: Orthopoedic Allograft Surgery, 3 – 10,

Springer Wien, New York.

Bush LF (1947),

The use of homogenous bone grafts. A preliminary report of the bone bank.

J Bone Joint Surg 29A: 620 – 628.

Calvo MS, Eyre DR, Grundberg CM (1996),

Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover.

Endocrine Reviews 17: 333 – 368.

Canalis E (1986),

Interleukin-1 has independent effects on deoxyribonucleic acid and collagen synthesis in cultures of rat calvariae.

Endocrinology 118(1): 74 – 81.

Canalis E (1987),

Effects of tumor necrosis factor on bone formation in vitro.

Endocrinology 121(5): 1596 – 1604.

Carrel A (1912),

The preservation of tissues and its application in surgery.

JAMA 59: 523 – 527.

Catinella FP, De Laria GA, De Wald RL (1990),

False aneurysm of the superior gluteal artery. A complication of iliac crest bone grafting.

Spine 15: 1360.

Centers for Disease Control (1988),

Transmission of HIV through bone transplantation: case report and public health recommendations.

MMWR 37: 595 – 599.

CDC, Center for Disease Control and Prevention (2002),

Update: Allograft Associated Bacterial Infections.

MMWR 51(10): 207 – 210.

Chakkalakal DA, Mashoof AA, Novak J, Strates BS, McGuire MH (1994),

Mineralization and pH relationships in healing skeletal defects grafted with demineralized bone matrix.

J Biomed Mater Res 28: 1439 – 1443.

Challis JH, Lyttle JA, Stuart AE (1975),

Strangulated lumbar hernia and volvulus following removal of iliac crest bone grafting.

Acta Orthop Scand 46: 230.

Cho TJ, Kim JA, Chung CY, Yoo WJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA, Choi ICH (2007),

Expression and Role of Interleukin-6 in Distraction Osteogenesis.

Calcif Tissue Int 80: 192 – 200.

Chou D, Storm PB, Campbell JN (2004),
Vulnerability of the subcostal nerve to injury during bone graft harvesting from the iliac crest.

J Neurosurg (Spine 1) 1: 87 – 89.

Ciapetti G, Ambrosio L, Marletta G, Baldini N, Giunti A (2006),
Human bone marrow stromal cells: I vitro expansion and differentiation for bone engineering.

Biomaterials 27: 6150 – 6160.

Conrad EU, Gretch DR, Obermeyer KR, Moogk MS, Sayers M, Wilson JJ, Strong DM (1995),

Transmission of the hepatitis-C-virus by tissue transplantation.

J Bone Joint Surg Am 77(2): 214 – 224.

Cowin SC (2001),

Bone Mechanics Handbook.

CRC Press, Boca Raton, Florida.

Czitrom AA, Axelrod T, Fernandes B (1985),

Antigen presenting cells and bone allotransplantation.

Clin Orthop Relat Res 197: 27 – 31.

De Boer H (1989),

Early research on bone transplantation.

In: Aebi M, Regazzoni P (eds), Bone Transplantation, 7 – 19,

Springer Verlag, Berlin Heidelberg.

Devlin RD, Reddy SV, Savino R, Ciliberto G, Roodman GD (1998),

IL-6 mediates the effects of IL-1 or TNF, but not PTHrP or 1,25(OH)₂D₃, on osteoclast-like cell formation in normal human bone marrow cultures.

J Bone Miner Res 13: 393 – 99.

Dodds RA, Merry K, Littlewood A, Gowen M (1994),
Expression of mRNA for IL1 beta, IL6 and TGF beta 1 in developing human bone and cartilage.

J Histochem Cytochem 42(6): 733 – 744.

Eggen BM, Nordbo SA (1992),
Transmission of HCV by organ transplantation (letter).
N Engl J Med 326: 411.

Ernst M, Jenkins BJ (2004),
Acquiring signalling specificity from the cytokine receptor gp130.
Trends Genet 20: 23 – 32.

Fattori E, Cappelletti M, Costa P, Sellitto C, Cantoni L, Carelli M, Faggioni R, Fantuzzi G, Ghezzi P, Poli V (1994),
Defective inflammatory response in interleukin 6-deficient mice.
J Exp Med 180: 1243 – 1250.

Flad HD, Gemsa D (1997),
Zytokine.
In: Gemsa D (ed), Immunologie Grundlagen-Klinik-Praxis, 4th ed., 45 – 69,
Georg Thieme Verlag Stuttgart.

Flannery CR, Little CB, Hughes CE, Curtis CL, Caterson B, Jones SA (2000),
IL-6 and its soluble receptor augment aggrecanase-mediated proteoglycan catabolism in articular cartilage.
Matrix Biol 19: 549.

Franchimont N, Wertz S, Malaise M (2005),
Interleukin-6: An osteotropic factor influencing bone formation?.
Bone 37: 601 – 606.

Friedlaender G (1983),
Immun responses to osteochondral allografts.
Clin Orthop Rel Res 174: 58 – 68.

Fuller K, Kirstein B, Chambers TJ (2006),
Murine Osteoclast Formation and Function: Differential Regulation by Humoral Agents.
Endocrinology 147(4):1979 – 1985.

Gao Y, Grassi F, Ryan MR, Terauchi M, Page K, Yang X, Weitzmann M, Pacifici R (2007),
IFN- γ stimulates osteoclast formation and bone loss in vivo via antigen-driven T-cell activation.
J Clin Invest 117: 122 – 132.

Garrel vT, Garbas J, Knaepler H, Mutters R (1993),
Optimierung des mikrobiologischen Keimnachweises bei der allogenen Knochentransplantation.
In: Becker, Beger, Hartel (eds) Chirurgisches Forum 93,
Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York.

Garrel vT, Hofmann C, Wagner N, Knaepler H, Gotzen L (1994),
Klinisch prospektive Studie zur Anwendung thermisch desinfizierter allogener Knochentransplantate.
58. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie,
Springer-Verlag, Berlin.

Garrel vT, Knaepler H, Gürtler L (1997),
Untersuchungen zur Inaktivierung von HIV-1 in humanen Femurköpfen durch Verwendung eines thermischen Desinfektionssystems Lobator SD-1.
Unfallchirurg 100: 375 – 381.

Garrel vT, Gotzen L (1998),

Allogene Knochentransplantation und Knochenbanking.

Unfallchirurg 101(9): 713 – 727.

Garrel vT (2003),

Persönliche Mitteilung auf der Grundlage einer Befragung von 1.400 chirurgischen/orthopädischen Kliniken in Deutschland aus dem Jahr 2001.

Gartner S, Kaplan HS (1980),

Long-term culture of human bone marrow cells.

Proc Natl Acad Sci 4756 – 4759.

Gilbert L, He X, Farmer P, Boden S, Kozlowski M, Rubin J, Nanes MS (2000),

Inhibition of osteoblast differentiation by tumor necrosis factor-alpha.

Endocrinology 141: 3956 – 3964.

Girasole G, Passeri G, Jilka RL, Manolagas SC (1994),

Interleukin-11: a new cytokine critical for osteoclast development.

J Clin Invest 93: 1516 – 24.

Godette GA, Kopta JA, Egle DM (1996),

Biomechanical effects of gamma irradiation on fresh frozen allografts in vivo.

Orthopedics 19(8): 649 – 53.

Greenwald AS, Boden SD, Goldberg VM, Khan Y, Laurencin CT, Rosier SN (2001),

Bone graft substitutes: facts, fictions, and clinical application.

JBJS 83A: 98 – 103.

Gross TP, Cox QG, Jinnah RH (1993),

History and current application of bone transplantation.

Orthopedics 16: 895 – 900.

Guha SC, Poole MD (1983),

Stress fracture of the iliac bone with subfascial femoral neuropathy: unusual complications at the bone graft donor site: Case report.

Br J Plast Surg 36: 305.

Hamad MM, Majeed SA (1989),

Incisional hernia through iliac crest defects. A report of three cases with a review of the literature.

Arch Orthop Trauma Surg 108: 383.

Han JH, Choi SJ, Kurihara N, Koide M, Oba Y, Roodman GD (2001),

Macrophage inflammatory protein-1alpha is an osteoclastogenic factor in myeloma that is independent of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand.

Blood 97(11): 3349 – 3353.

Hayashi K, Matsuguchi N, Uenoyama K, Kanemaru T, Sugioka Y (1989),

Evaluation of metal implants coated with several types of ceramics as biomaterial.

J Biomed Mat Res 23: 1247 – 1259.

Heymann D, Rouselle AV (2000),

gp130 cytokine family and bone cells.

Cytokine 12: 1455 – 1468.

Hilfenhaus J, Gregersen JP, Mehdi S, Volk R (1990),

Inactivation of HIV-1 and HIV-2 by various manufacturing procedures for human plasma proteins.

Cancer Detection and Prevention 14(3): 369 – 376.

Hocking WG, Golde DW (1980),

Long-term human bone marrow culture.

Blood 56: 118 – 124.

Hofbauer LC, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S (1999),
Interleukin-1 α and tumor necrosis factor- α , but not interleukin-6 stimulate
osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells.
Bone 25: 255 – 259.

Hofbauer LC, Khosla D, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL (2000),
The roles of osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption.
J Bone Mineral Res 15: 2 – 12.

Hofmann A, Hofmann C, Gotzen L (2000),
Einfluß verschiedener Knochendesinfektions- und Sterilisationsverfahren auf die
Osteoblastenfunktion.
Unfallchirurg 103: 380 – 388.

Hofmann A, Konrad L, Hessmann MH, Kiichle R, Korner J, Rompe JD, Rommens PM
(2005),
The influence of bone allograft processing on osteoblast attachment and function.
Journal of Orthopaedic Research 23: 846 – 854.

Hofmann C, Garrel vT, Gotzen L (1996),
Knochenbankmanagement bei Verwendung eines thermischen Desinfektionssystems
(Lobator SD-1).
Unfallchirurg 99: 498 – 508.

Horowitz MC, Friedlaender G (1991),
Induction of specific T-cell responsiveness allogenic bone.
J Bone Joint Surg 73A: 1157 – 1168.

Huang W, O’Keefe RJ, Schwarz EM (2003),
Exposure to receptor-activator of NF κ B ligand renders pre-osteoclasts resistant to
IFN- γ by inducing terminal differentiation.
Arthritis Res Ther 5: R49 – R59.

Hyatt GW (1950),
Fundamentals in the use and preservation of homogenous bone.
U.S. Armed Forces Medical J 1: 841 – 852.

Inclan A (1942),
Use of the preserved bone grafts in orthopaedic surgery.
J Bone Joint Surg 24A: 81 – 96.

Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH, Akatsu T, Abe E, Nakamura Y, Yamaguchi A, Yoshiki S, Matsuda T, Hirano T (1990),
IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption.
J Immunol 145: 3297 – 3303.

James JIP (1953),
Tuberculosis transmitted by banked bone.
J Bone Joint Surg 35B: 578 – 580.

Jansen JH, Kluin-Nelemans JC, Van Damme J, Wientjens GJ, Willemze R, Fibbe W E (1992),
Interleukin 6 is a permissive factor for monocytic colony formation by human hematopoietic progenitor cells.
J Exp Med 175: 1151 – 1154.

Jensen JA, Hunt TK, Scheuenstuhl H, Banda MJ (1986),
Effect of lactate, pyruvate, and pH on secretion of angiogenesis and mitogenesis factors by macrophages.
Lab Invest 54: 574 – 578.

Jergesen H, Chua J, Kao R, Kaban L (1991),
Age effects on bone induction by demineralized bone powder.
Clin Orthop Rel Res 268: 253 – 259.

Jerosch J, Castro WHM, Granrath M, Rosin H (1990),
Knochenbanken in der BRD. Ergebnisse einer Befragung.
Unfallchirurg 93: 334 – 338.

Jilka RL, Hangoc G, Girasole G, Passeri G, Williams DC, Abrams JS, Boyce B,
Broxmeyer H, Manolagas SC (1992),
Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6.
Science 257: 88 – 91.

Jones SA, Horiuchi S, Topley N, Yamamoto N, Fuller GM (2001),
The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in
disease.
FASEB J 15: 43 – 58.

Kalla P, Hintz-Obertreis P, Wilke A, Griss P, Seiler FR, Rude E, Krumwieg D (1991),
Bone marrow obtained during hip surgery: a novel source for studies of hemopoiesis in
human long-term bone marrow culture (LTBMC).
Behring Inst Mitt 93 – 98.

Kalla P, Oster W, Seiler FR, Rude E, Krumwieg D (1992),
Myelosuppressive effects of cytosine arabinoside (Ara-C) on growth factor-dependent
human long-term bone marrow cultures (LTBMC).
Int J Cell Cloning 10(1): 54 – 62.

Kakaiya R, Müller WV, Gudino M (1991),
Tissue transplant-transmitted infections.
Transfusion 31: 277 – 284.

Kaysinger KK, Ramp WK (1998),
Extracellular pH modulates the activity of cultured human osteoblasts.
J Cell Biochem 68: 83 – 89.

Kearney JN, Lomas RJ (1997),

The osteoinductive properties of demineralized bone matrix grafts.

In: Philipps GO, Versen vR, Strong DM, Nather A (eds), Advances in Tissue Banking, Vol 1: 43 – 71.

Key LL Jr, Rodriguiz RM, Willi SM, Wright NM, Hatcher HC, Eyre DR, Cure JK, Griffin PP, Ries WL (1995),

Long-term treatment of osteopetrosis with recombinant human interferon gamma.

N Engl J Med 332: 1594 – 1599.

Kim N, Kadono Y, Takami M, Lee J, Lee SH, Okada F, Kim JH, Kobayashi T, Odgren PR, Nakano H, Yeh WC, Lee SK, Lorenzo JA, Choi Y (2005),

Osteoclast differentiation independent of the TRANCE-RANK-TRAF6 axis.

J Exp Med 202: 589 – 595.

Kishimoto T (2006),

Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine.

Arthritis Research & Therapy 8(Suppl 2): S2.

Kitazawa R, Kimble RB, Vannice JL, Kung VT, Pacifici R (1994),

Interleukin-1-receptor antagonist and tumor necrosis factor binding protein decrease osteoclast formation and bone resorption in ovariectomized mice.

J Clin Invest 94: 2397 – 2406.

Kleinheinz J (2000),

Die Beeinflussung der Angiogenese durch Vascular endothelial growth factor im Verlauf der Knochenregeneration des Unterkiefers. (Habilitationsschrift).

Mund- und Kiefer-Gesichtschirurgie, Münster, Westfälische Wilhelms-Universität.

Knaepler H, Laubach S, Gotzen L (1990),

Die Knochenbank – ein standardisiertes Verfahren.

Chirurg 61: 833 – 835.

Knaepler H, Haas H, Puschel HU (1991),
Biomechanical properties of heat and irradiation treated spongiosa.
Unfallchirurgie 17(4): 194 – 199.

Knaepler H, Garrel vT, Seipp HM, Ascherl R, Gotzen L (1992a),
Autoklavierung von allogenen Knochentransplantaten als Alternative zur
konventionellen Knochenbank?
Orthop Praxis 92: 18 – 22.

Knaepler H, Garrel vT, Seipp HM, Ascherl R (1992b),
Experimentelle Untersuchungen zur thermischen Desinfektion und Sterilisation
allogener Knochentransplantate und deren Auswirkungen auf die biologische
Wertigkeit.
Unfallchirurg 95: 477 – 484.

Knaepler H, Garrel vT, Gotzen L (1994a),
Untersuchungen zur Desinfektion und Sterilisation allogener Knochentransplantate.
Hefte Unfallheilk 235: 1 – 101.

Knaepler H, Garrel vT, Gürtler L (1994b),
Die allogene Knochentransplantation – Eine aktuelle Standortbestimmung.
Deutsches Ärzteblatt 15: 1052 – 1057.

Kobayashi KN, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Takami M, Kotake S, Nakagawa N,
Kinosaki M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Morinaga T, Higashio K, Martin TJ,
Suda T (2000),
Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism
independent of the ODF/RANKLRANK interaction.
J Exp Med 191: 275 – 286.

Kon T, Cho TJ, Aizawa T, Yamazaki M, Nooh N, Graves D, Gerstenfeld LC, Einhorn TA (2001),

Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF- κ B ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing.

J Bone Miner Res 16: 1004 – 1014.

Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveirados-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM (1999),

OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis.

Nature 397: 315 – 323.

Kopf M, Baumann H, Freer G, Freudenberg M, Lamers M, Kishimoto T, Zinkernagel R, Bluethmann H, Köhler G (1994),

Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice.

Nature 368: 339 – 342.

Kotake S, Sato K, Kim KJ, Takahashi N, Udagawa N, Nakamura I, Yamaguchi A, Kishimoto T, Suda T, Kashiwazaki S (1996),

Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptors in the synovial fluids from rheumatoid arthritis patients are responsible for osteoclast-like cell formation.

J Bone Miner Res 11: 88 – 95.

Krieger NS, Sessler NE, Bushinsky DA (1992),

Acidosis inhibits osteoblastic and stimulates osteoclastic activity in vitro.

Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol 262: F442 – F448.

Kudo O, Sabokbar A, Pocock A, Itonaga I, Fujikawa Y, Athanasou NA (2003),

Interleukin-6 and interleukin-11 support human osteoclast formation by a RANKL-independent mechanism.

Bone 32: 1 – 7.

Kübler N (1997),

Osteoinduktion und -reparation.

Mund Kiefer GesichtsChir 1(1): 2 – 25.

Kühne JH, Bartl R, Hammer C, Refior HJ, Jansson V, Zimmer M (1992),

Moderate heat treatment of bone allografts.

Arch Orthop Trauma Surg 112: 18 – 22.

Kühne JH, Refior HJ, Jansson V, DeToma G, Liepold KP, Verpoorten U (1994),

Initial clinical results with heat-treated homologous bone transplants.

Z Orthop Ihre Grenzgeb 132(2): 102 – 111.

Kuner EH, Schlickewei W, Huber-Lang M, Schaefer DJ, Laubenberger J (1998),

Über die Verwendung autoklavierter Spongiosa.

Unfallchirurg 101: 870 – 876.

Kurihara N, Bertolini D, Akiyam Y, Roodman GD (1990),

Il-6 stimulates osteoclast like multinucleated cell formation in long term human marrow cultures by inducing Il-1 release.

J Immunol 144: 4226 – 4230.

Kyoto Universität (1991),

Mechanische Festigkeit des erhitzten Knochens.

Kyoto Universität (2001),

Die Geschwindigkeit der Knocheneinheilung in Abhängigkeit von der Temperatur des erhitzten Knochentransplantates.

Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliot R, Colombero A, Elliot G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ (1998),
Osteoprotegerin (OPG) ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation.

Cell 93: 165 – 176.

Lacey DL, Tan HL, Lu J, Kaufman S, Van G, Qui W, Rattan A, Scully S, Fletcher F, Juan T, Kelley M, Burgess TL, Boyle WJ, Polverino AJ (2000),
Osteoprotegerin ligand modulates murine osteoclast survival in vitro and in vivo.
Am J Pathol 157: 435 – 448.

Lam J, Takeshita S, Barker JE, Kanagawa O, Ross FP, Teitelbaum SL (2000),
TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand.
J Clin Invest 106: 1481 – 1488.

Lexer E (1908a),
Die Verwendung der freien Knochenplastik nebst Versuchen über Gelenkversteifung und Gelenktransplantation.
Archiv für klinische Chirurgie 68: 940 – 948.

Lexer E (1908b),
Über Gelenktransplantation.
Med Klin 4: 815.

Lexer E (1911),
Über freie Transplantationen.
Langenbeck's Arch klin Chir 95: 827.

Lexer E (1924),
Die freie Knochentransplantation.
Neue deutsche Chir 26b, Ferdinand Enke.

Lexer E (1925),
Joint transplantation and arthroplasty.
Surg Gynec Obstet 40: 782 – 788.

Lim EV, Lavadia WD, Roberts JM (1996),
Superior gluteal artery injury during iliac bone grafting for spinal fusion. A case report
and literature review.
Spine 21(20): 2376 – 2378,

MacEwen W (1881),
Observations concerning transplantation of bone: illustrated by a case of inter-human
osseous transplantation, whereby over two-thirds of the shaft of a humerus was restored.
Proc Royal Soc (London) 32: 232 – 247.

Magnusson P, Larsson L, Magnusson M, Davie MWJ, Sharp CA (1999),
Isoforms of bone alkaline phosphatase: Characterization and origin in human trabecular
and cortical bone.
J Bone Miner Res 14:1926 – 1933.

Manolagas SC (1995),
Bone marrow, clastic, and blastic cell system: quo vadis?
Calcif Tissue Int 56(Suppl 1): S52 – 53.

Matsuda T, Kishimoto T (1998),
Interleukin 6.
In: Delves PJ and Roitt IM (eds), Encyclopedia of Immunology, 2nd ed., 1458 – 1461,
Academic Press INC., San Diego.

Mizuno A, Amizuka N, Irie K, Murakami A, Fujise N, Kanno T, Sato Y, Nakagawa N,
Yasuda H, Mochizuki S, Gomibuchi T, Yano K, Shima N, Washida N, Tsuda E,
Morinaga T, Higashio K, Ozawa H (1998),
Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor /
osteoprotegerin.
Biochem Biophys Res Commun 247: 610 – 615.

Naka T, Nishimoto N, Kishimoto T (2002),
The paradigm of IL-6: from basic science to medicine.
Arthritis Res 4: 233 – 242.

Nanes MS (2003),

Tumor necrosis factor- α : molecular and cellular mechanisms in skeletal pathology.

Gene 321: 1 – 15.

Nicolas V, Prewett A, Bettica P, Mohan S, Finkelman RD, Baylink DJ, Farley JR (1994),

Age-related decrease in insulin-like growth factor-I and transforming growth factor- β in femoral cortical bone from both men and women.

JCE&M 78(5): 1011 – 1016.

Nyman MT, Paavolainen P, Forsius S, Lamberg-Allardt C (1991),

Clinical evaluation of fracture healing by serum osteocalcin and alkaline phosphatase.

Ann Chir Gynaecol 80(3): 289 – 293.

O'Brien CA, Gubrij I, Lin S-C, Saylor RL, Manolagas SC (1999),

STAT3 activation in stromal/osteoblastic cells is required for induction of the receptor activator of NF- κ B ligand and stimulation of osteoclastogenesis by gp130-utilizing cytokines or interleukin-1 but not 1,25-dihydroxyvitamin D3 or parathyroid hormones.

J Biol Chem 274: 19301 – 19308.

Okano A, Suzuki C, Takatsuki F, Akiyama Y, Koike K, Nakahata T, Hirano T, Kishimoto T, Ozawa K, Asano S (1989),

Effects of interleukin-6 on hematopoiesis in bone marrow-transplanted mice.

Transplantation 47: 738 – 740.

Ollier L (1867),

Traité experimental et clinique de la regeneration des os.

Victor Mason et Fils, Paris.

Ooura K, Ikenaga M, Kotoura Y, Yamamuro T (1990),

Die Fähigkeit zur Osteokonduktion des erhitzten Knochens. (Übersetzung aus dem Japanischen).

J Jpn Orthop Assoc 64(8).

Owen M (1985),

Lineage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system.

In: Peck WA (ed), Bone and Mineral Research, 1 – 24,

Elsevier Amsterdam.

Owen M, Friedenstein AJ (1988),

Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors.

Ciba Found Symp 136: 42 – 60.

Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, Kennedy MB, Pockwinse S, Lian JB, Stein GS (1990),

Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix.

J Cell Physiol 143(3): 420 – 430.

Palmqvist P, Persson E, Conaway HH, Lerner UH (2002),

IL-6, leukaemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of NF- κ B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF- κ B in mouse calvaria.

J Immunol 169: 3353 – 3362.

Parfitt AM (1994),

Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone.

J Cell Biochem 55(3): 273 – 86.

Parfitt AM (1998),

Osteoclast precursors as leukocytes: importance of the area code.

Bone 23(6): 491 – 494.

Park SA, Schin JW, Yang YI, Kim YK, Park KD, Lee JW, Jo, IH, Kim YJ (2004),
In vitro study of osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells on heat-treated
porcine trabecular bone blocks.
Biomaterials 25: 527 – 535.

Parrish FF (1973),
Allograft replacement of all or part of the end of a long bone following excision of a
tumor: report of twenty-one cases.
J Bone Joint Surg 55A: 1 – 22.

Peter HH, Pichler WJ (1996),
Klinische Immunologie, 35 – 43.
Urban & Schwarzer, München Wien Baltimore.

Phemister DB (1914),
The fate of transplanted bone and regenerative power of its various constituents.
Surg Gynecol Obstet 19: 303.

Prockop DJ (1997),
Marrow stromal cells as stem cells for non-hematopoietic tissues.
Science 276: 71 – 74.

Pruss A, Seibold M, Benedix F, Frommelt L Garrel vT, Gurtler L, Dorffel Y, Pauli G,
Gobel UB (2003a).
Validation of the „Marburg bonebank system“ for thermodisinfection of allogenic
femoral head transplants using selected bacteria, fungi, and spores.
Biologicals 31(4): 287 – 294.

Pruss A, Kao M, Garrel vT, Frommelt L Gurtler L, Benedix F, Pauli G (2003b),
Virus inactivation in bone tissue transplants (femoral heads) by moist heat with the
„Marburg bonebank system“.
Biologicals 31(1): 75 – 82.

Ramsay AJ, Husband AJ, Ramshaw IA, Bao S, Matthaei KI, Koehler G, Kopf M (1994),

The role of interleukin-6 in mucosal IgA antibody responses in vivo.

Science 264: 561 – 563.

Reddi AH (1998),

Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration.

Nature Biotechnoln 16: 247 – 252.

Richtlinie 2004/23/EG des Europäischen Parlamentes und des Rates vom 31.03.2004 zur „Festlegung von Qualitäts- und Sicherheitsstandards für die Spende, Beschaffung, Testung, Verarbeitung, Konservierung, Lagerung und Verteilung von menschlichen Geweben und Zellen“.

Official Journal of the European Union, L102/58, 07.04.2005.

Roodman GD (1992),

Interleukin-6: an osteotropic factor?

J Bone Miner Res 7: 475 – 478.

Roodman GD (2006),

Regulation of osteoclast differentiation.

Ann N Y Acad Sci 1068: 100 – 109.

Rozen N, Ish-Shalom S, Rachmiel A, Stein H, Lewinson D (2000),

Interleukin-6 Modulates Trabecular and Endochondral Bone Turnover in the Nude Mouse by Stimulating Osteoclast Differentiation.

Bone 26(5): 469 – 474.

Rozen N, Lewinson D, Bick T, Jacob ZC, Stein H, Soudry M (2007),

Fracture repair: Modulation of fracture-callus and mechanical properties by sequential application of IL-6 following PTH 1–34 or PTH 28–48.

Bone 41: 437 – 445.

Sanan A, Haines SJ (1997),
Repairing holes in the head: a history of cranioplasty.
Neurosurgery 40: 588 – 602.

Sasai M, Saeki Y, Ohshima S, Nishioka K, Mima T, Tanaka T, Katada Y, Yoshizaki K, Suemura M, Kishimoto T (1999),
Delayed onset and reduced severity of collagen-induced arthritis in interleukin-6 deficient mice.
Arthritis Rheum 42: 1635 – 1643.

Sasaki H, Balto K, Kawashima N, Eastcott J, Hoshino K, Akira S, Stashenko P (2004),
Gamma Interferon (IFN- γ) and IFN- γ -Inducing Cytokines Interleukin-12 (IL-12) and IL-18 Do Not Augment Infection-Stimulated Bone Resorption In Vivo,
Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 11(1): 106 – 110.

Sato K, Satoh T, Shizume K, Yamakawa Y, Ono Y, Demura H, Akatsu T, Takahashi N, Suda T (1992),
Prolonged decrease of serum calcium concentration by murine gamma interferon in hypercalcemic, human tumor (EC-GI)-bearing nude mice.
Cancer Res 52: 444 – 449.

Schenk RK (1986),
Bone response to grafts and implants.
In: Lin OCC, Chao EYS (eds), Perspectives on biomaterials, Materials science monographs 121 – 136,
Elsevier, Taipei, Taiwan.

Schindler R, Mancilla J, Endres S, Ghorgani R, Clark SC, Dinarello CA (1990),
Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF.
Blood 75: 40 – 47.

Schratt HE, Regel G, Lobenhoffer P, Tscherne H (1996a),
Die Organisation einer Knochen-und Gewebebank.
Unfallchirurg 99: 880 – 888.

Schratt HE, Regel G, Kiesewetter B, Tscherne H (1996b),
HIV-Infektion nach allogener Knochentransplantation.
Unfallchirurg 99(9): 679 – 684.

Shimizu K, Masumi S, Yano H, Fukunaga T, Ikebe S, Shin S (1999),
Revascularization and new bone formation in heat-treated bone grafts.
Arch Orthop Trauma Surg 119: 57 – 61.

Shin S, Yano H, Fukunaga T, Ikebe S, Shimizu K, Kaku N, Nagatomi H, Masumi S
(2005),
Biomechanical properties of heat-treated bone grafts.
Arch Orthop Trauma Surg 125(1):1 – 5.

Shutkin NM (1954),
Homologous-serum hepatitis following the use of refrigerated bone-bank bone. Report
of a case.
J Bone Joint Surg 36A: 160 – 162.

Simonds RJ, Scott D, Holmberg MPH, Richard L (1992),
Transmission of human immunodeficiency virus Typ I from seronegative organ and
tissue donor.
N Engl Med 326: 726 – 732.

Sims NA, Jenkins BJ, Quinn JM, Nakamura A, Glatt M, Gillespie MT, Ernst M, Martin
TJ (2004),
Gp130 regulates bone turnover and bone size by distinct downstream signaling
pathways.
J Clin Invest 113: 379 – 389.

Spector JA, Mehrara BJ, Greenwald JA, Saadeh PB, Steinbrech DS, Bouletreau PJ, Smith LP, Longaker MT (2001),

Osteoblast expression of vascular endothelial growth factor is modulated by the extracellular microenvironment.

Am J Physiol Cell Physiol 280: C72 – C80.

Stein GS, Lian JB (1993),

Molecular mechanism mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype.

Endocr Rev 14: 424 – 442.

Steinbrech DS, Mehrara BJ, Saadeh PB, Chin G, Dudziak ME, Gerrets RP, Gittes GK, Longaker MT (1999),

Hypoxia regulates VEGF expression and cellular proliferation by osteoblasts in vitro.

Plast Reconstr Surg 104: 738 – 747.

Steinbrech DS, Mehrara BJ, Saadeh PB, Greenwald JA, Spector JA, Gittes GK, Longaker MT (2000),

VEGF expression in an osteoblast-like cell line is regulated by a hypoxia response mechanism.

Am J Physiol Cell Physiol 278: C853 – C860.

Strehl R, Schumacher K, De Vries U, Minuth WW (2002),

Proliferating cells versus differentiated cells in tissue engineering.

Tissue Eng 8: 37 – 42.

Strong DM (1994),

Report of transmission of Hepatitis C by bone transplantation.

17th Annual Meeting – American Association of Tissue Banks (AATB) 22.-25.10.1993, Boston – USA.

Stützle H, Hallfeldt K, Mandelkow H, Kessler S, Schweiberer L (1995),

Knochenneubildung durch hitzebehandelte Spongiosa.

Osteologie 4 (Suppl 1): 73 – 74.

Suda T, Udagawa N, Nakamura I, Miyaura C, Takahashi N (1995),

Modulation of osteoclast differentiation by local factors.

Bone 17 (Supp 1): 87s – 91s.

Suzuki C, Okano A, Takatsuki F, Miyasaka Y, Hirano T, Kishimoto T, Ejima D, Akiyama Y (1989),

Continuous perfusion with Interleukin 6 (IL-6) enhances production of hematopoietic stem cells (CFU-S).

Biochem Biophys Res Commun 159: 933 – 938.

Swenson O, Claff CL (1946),

Changes in the hydrogen ion concentration of healing fractures.

Proc Soc Exp Biol Med 61: 151 – 154.

Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, Chiba T, Murata S, Sato K, Takaoka A, Yokochi T, Oda H, Tanaka K, Nakamura K, Taniguchi T (2000),

T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma.

Nature 408: 600 – 605.

Teitelbaum SL (2000),

Bone resorption by osteoclasts.

Science 289: 1504 – 1508.

Terheyden H, Jepsen S, Vogeler S, Tucker M, Rueger DC (1997),

Recombinant human osteogenic protein 1 in the rat mandibular augmentation model: differences in morphology of the newly formed bone are dependent on the type of carrier.

Mund Kiefer Gesichts Chir 1: 272 – 275.

Terheyden H, Jepsen S (1999),

Hartgeweberegeneration durch Wachstumsfaktoren und morphogene Proteine.

Implantologie 4: 359 – 378.

Tilg H, Trehu E, Atkins MB, Dinarello CA, Mier JW (1991),
Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1
receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55.
Blood 83: 113 – 118.

Tomford WW (2000),
Bone allografts: Past, present and future.
Cell and Tissue Banking 1: 105 – 109.

Ubhi CS, Morris DL (1984),
Fracture and herniation of bowel at bone graft donor site in the iliac crest.
Injury 16: 202.

Urist MR, Silverman BF, Buring K, Dubuc FL, Rosenberg JM (1967),
The bone induction principle.
Clin Orthop 53: 243 – 283.

Urist MR, O'Connor BT, Burwell RG (1994),
Bone Grafts, Derivatives and Substitutes.
Butterworth and Heinemann, Oxford.

Väänänen K (1996),
Principles of bone biology.
Academic Press, San Diego.

Vastel L, Meunier A, Siney H, Sedel L, Courpied JP (2004).
Effect of different sterilization processing methods on the mechanical properties of
human cancellous bone allografts.
Biomaterials. 25(11): 2105 – 2110.

Versen vR, Heider H, Kleemann I, Starke R (1992),
Chemische Sterilisation biologischer Implantate mit einer Kombinationsmethode.
In: Pesch HJ, Stöß H, Kummer B (eds), Osteologie aktuell 7(suppl.): 380 – 386,
Springer-Verlag.

Veys EM, Menkes CJ, Emery P (1997),

A randomized, double-blind study comparing twenty-four-week treatment with recombinant interferon-gamma versus placebo in the treatment of rheumatoid arthritis.

Arthritis Rheum 40: 62 – 68.

Voggenreiter G, Ascherl R, Blumel G Schmit Neuerburg KP (1994),

Effects of Preservation and Sterilization on Cortical Bone Grafts, A Scanning Electron Microscopic Study.

Arch Orthop Trauma Surg 113: 294 – 296.

Walter vPh (1821),

Wiedereinheilung der bei der Trepanation ausgebohrten Knochenscheibe.

J Chir Augenheilk 2: 571.

Warnke PH, Springer IN, Acil Y, Julga G, Wiltfang J, Ludwig K, Russo PA, Sherry E, Sivananthan S, Hedderich J, Terheyden H (2006),

The mechanical integrity of in vivo engineered heterotopic bone.

Biomaterials 27(7): 1081 – 1087.

Wei S, Kitaura H, Zhou P, Ross FP, Teitelbaum SL (2005),

IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis.

J Clin Invest 115: 282 – 290.

Weitzmann MN, Pacifici R (2005),

The role of T lymphocytes in bone Metabolism.

Immunological Reviews 208: 154 – 168.

Wetzel AC, Stich H, Caffesse RG (1995),

Bone apposition onto oral implants in sinus area filled with different grafting materials.

A histological study in beagle dogs.

Clin Oral Implants Res 6: 155 – 163.

Wilke A, Orth J, Griss P, Nehls V, Drenckhahn D (1991),
Development of a human bone marrow cell culture to test the cytocompatibility of bulk hydroxyapatite materials.

In: Ravaglioli A, Krajewski A (eds), Bioceramics and the human body, 471 – 476,
Elsevier Applied Science.

Wilke A, Orth J, Kienapfel H, Schröder G, Griss P (1992),
Sensitivity of a human bone marrow cell culture to test the biocompatibility of different biomaterials.

Trans., 4th World Biomaterial Congress, April (1992), Berlin, (162)

Wilke A, Schröder G, Orth J, Griss P, Franke RP (1993),
Evaluation of the biocompatibility of implant materials with human bone marrow cell cultures.

Biomed Tech (Berl) 38(6): 126 – 129.

Wilke A, von Hirschheydt S, Orth J, Kienapfel H, Griss P, Franke RP (1995),
Human bone marrow cell culture – a sensitive method for the evaluation of the biocompatibility of materials used in orthopedics.

Z Orthop Ihre Grenzgeb 133(2):159 – 165.

Wilke A, Orth J, Lomb M, Fuhrmann R, Kienapfel H, Griss P, Franke RP (1998),
Biocompatibility analysis of different biomaterials in human bone marrow cell cultures.

J Biomed Mater Res 40(2): 301 – 306.

Wilke A, Landgraff M, Orth J, Poenitz H, Kienapfel H, Boelte K, Griss P, Franke RP (1999),

Human bone marrow cell culture – A sensitive method for determination of the biocompatibility of implant materials.

ATLA 27: 137 – 151.

Wilke A, Endres S, Stürz S, Wessel C, Griss P, Jones D (2000),
Zytokinprofil einer humanen Knochenmarkszellkultur unter Exposition von Chrom-
Cobalt-Partikeln.
Zeitschrift für Osteologie.

Wilke A, Endres S, Griss P, Herz U (2002),
Cytokine profile of a human bone marrow cell culture on exposure to titanium-
aluminium-vanadium particles.
Z Orthop Ihre Grenzgeb 140(1): 83 – 89.

Wintermantel E und Suk-Woo H (2002),
Medizintechnik mit biokompatiblen Werkstoffen und Verfahren.
3. überarb. und erw. Aufl.: Springer Verlag.

Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer (1996),
Richtlinien zum Führen einer Knochenbank.
Deutsches Ärzteblatt 93(34/35): 2166 – 2171.

Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer (2001),
Richtlinien zum Führen einer Knochenbank.
Deutsches Ärzteblatt 98(15): 1011 – 1016.

Wong BR, Rho J, Arron J, Robinson E, Orlinick J, Chao M, Kalachikov S, Cavani E,
Bartlett FS, Frankel WN, Lee SY, Choi Y (1997),
TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-
jun N-terminal kinase in T cells.
J Biol Chem 272: 25190 – 25194.

Wong PK, Campbell IK, Egan PJ, Ernst M, Wicks IP (2003),
The role of the interleukin-6 family of cytokines in inflammatory arthritis and bone
turnover.
Arthritis Rheum 48: 1177 – 1189.

Wozniak M, Fausto A, Carron CP, Meyer DM, Hruska KA (2000),
Mechanically strained cells of the osteoblast lineage organize their extracellular matrix
through unique sites of alphabeta3-integrin expression.
J Bone Miner Res 15: 1731 – 1745.

Wutzler P, Sauerbrei A (2000),
Virucidal efficacy of a combination of 0.2% peracetic acid and 80% (v/v) ethanol
(PAA-ethanol) as a potential hand disinfectant.
J Hosp Infect 46: 304 – 308.

Yao KL, Todescan Jr R, Sodek J (1994),
Temporal changes in matrix protein synthesis and mRNA expression during
mineralized tissue formation by adult rat bone marrow cells in culture.
J Bone Miner Res 9(2): 231 – 240.

Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu
A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N,
Takahashi N, Suda T (1998),
Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin / osteoclastogenesis-
inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL.
Proc Natl Acad Sci USA 95: 3597 – 3602.

Zoricic S, Bobinac D, Lah B, Maric I, Cvijanovic O, Bajek S, Golubovic V, Mihelic R
(2002),
Study of the Healing Process after Transplantation of Pasteurized Bone Grafts in
Rabbits.
Acta Med Okayama 56(3): 121 – 128.

VII. Anhang

VII.1 Abkürzungsverzeichnis

A.	=	Arteria
Abb.	=	Abbildung
Abw.	=	Abweichung
ad.	=	addiere
AIDS	=	acquired immune deficiency syndrome
AP	=	Alkalische Phosphatase
ATP	=	Adenosintriphosphat
Bas	=	Basophile
BMP	=	bone morphogenic proteins
BSA	=	bovine serum albumine
BVDV	=	bovine viral diarrhoea virus
bzw.	=	beziehungsweise
C	=	Celsius
CFU	=	colony forming units
cm	=	Centimeter
CSF	=	colony stimulating factor
dest.	=	destilata
d.h.	=	das heißt
DNA	=	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	=	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	=	enzyme linked immunosorbent assay
Eo	=	Eosinophile
F	=	Fibroblasten

Fa.	=	Firma
FKS	=	fetales Kälberserum
g	=	Gramm
G-CSF	=	granulocyte colony stimulating factor
GEMM	=	Granulozyten-Erythrozyten-Monozyten-Makrophagen
GmbH	=	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GMCSF	=	granulocyte-macrophage-colony stimulating-factor
HIM	=	haematopoietic inductive microenvironment
HIV	=	human immunodeficiency virus
HS	=	Pferdeserum
HTLV	=	humanes T-Zell-Leukämie-Virus
IE	=	Internationale Einheit
IFN	=	Interferon
Ig	=	Immunglobulin
IL	=	Interleukin
IL-1ra	=	Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist
IMDM	=	Iscove's modified Dulbecco's medium
kD	=	Kilodalton
kV	=	Kilovolt
l	=	Liter
LDH	=	Lactatdehydrogenase
LPS	=	Lipopolysaccharid
M	=	molar
mA	=	Milliampere
MALT	=	mucosa associated lymphatic tissue
max.	=	maximal
M-CSF	=	macrophage colony stimulating factor
mg	=	Milligramm

MHC	=	major histocompatibility complex
Mio.	=	Million
ml	=	Milliliter
mm	=	Millimeter
mmol	=	Millimol
MW	=	Mittelwert
µg	=	Microgramm
µl	=	Microliter
µm	=	Micrometer
N ₂	=	Stickstoff
NaHCO ₃	=	Natriumhydrogencarbonat
NaCl	=	Natriumchlorid
NADH	=	Nicotinamid Adenindinucleotid Hydrogen
NCAM	=	neural cell adhesions molecule
NFκB	=	nuclear factor κB
ng	=	Nanogramm
NKZ	=	Natürliche Killer Zellen
nm	=	Nanometer
O	=	Sauerstoff
OP	=	Operationssaal
OPG	=	Osteoprotegrin
osm	=	osmolar
PBS	=	phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
PES	=	Peroxyessigsäure
pg	=	Picogramm
RANK	=	Rezeptor-Aktivator des Zellkernfaktors κB
RANKL	=	Rezeptor-Aktivator des Zellkernfaktors κB Ligand
REM	=	Rasterelektronenmikroskopie
SOP	=	standard operation procedure

Tab.	=	Tabelle
TBS	=	Triphosphate buffered saline
TGF	=	transforming growth factor
TNF	=	Tumornekrosefaktor
U	=	Units
USA	=	United States of America
v.	=	von
VEGF	=	vascular endothelial growth factor
z. B.	=	zum Beispiel

VII.2 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1:	Darstellung der Hämatopoese unter Einfluss verschiedener Zytokine.....	19
Abb. 2:	Versuchsaufbau für die Zellkultur (über 12 Wochen).....	35
Abb. 3:	Bohren der Knochenplättchen	37
Abb. 4:	Trypanfärbung einer Zellkultur nach 12 Wochen Kulturdauer.	49
Abb. 5:	Lichtmikroskopische Kontrolle der humanen Knochenmarkszellkultur....	55
Abb. 6:	Zellrasen nach 16 Tagen Kulturdauer.	56
Abb. 7:	Verbindung zweier Knochenplättchen nach 34 Tagen Zellkultur.....	57
Abb. 8:	Zellrasen der Zellkultur „autolog“ nach 20 Tagen Zellkultur.	58
Abb. 9:	pH-Werte des Langzeitversuchs der Mediumwechsel 1 bis 14.....	60
Abb. 10:	pH-Werte des Langzeitversuchs der Mediumwechsel 15 bis 42.....	61
Abb. 11:	pH-Werte des Langzeitversuchs relativ zum Medium aufgetragen	61
Abb. 12:	Zellzahl am Tag der Knochenmarkspräparation.	63
Abb. 13:	Zellzahl bei der Kontrollkultur am 3. Mediumwechsel.....	64
Abb. 14:	Zellzahl bei der Kontrollkultur am 10. Mediumwechsel.....	64
Abb. 15:	Zellzahl bei der Kontrollkultur am 22. Mediumwechsel.....	64
Abb. 16:	Zellzahl bei der Zellkultur „Telos“ am 3. Mediumwechsel.	65
Abb. 17:	Zellzahl bei der Zellkultur „Telos“ am 10. Mediumwechsel.	65
Abb. 18:	Zellzahl bei der Zellkultur „Telos“ am 22. Mediumwechsel.	65
Abb. 19:	Zellzahl bei der autologen Zellkultur am 3. Mediumwechsel.	66
Abb. 20:	Zellzahl bei der autologen Zellkultur am 10. Mediumwechsel.	66
Abb. 21:	Zellzahl bei der autologen Zellkultur am 22. Mediumwechsel.	66
Abb. 22:	Gesamtzahl abgenommenen Zellen im Mediumüberstand (3 ml).....	67
Abb. 23:	Zellzahlen im Mediumüberstand der Kontrollkultur „nur Zellen“	69
Abb. 24:	Zellzahlen im Mediumüberstand der Zellkultur „Telos“.	69
Abb. 25:	Zellzahlen im Mediumüberstand der Zellkultur „autolog“.	70
Abb. 26:	Lactat-Werte im Verlauf der Mediumwechsel 1 bis 14.	72
Abb. 27:	Lactat-Werte im Verlauf der Mediumwechsel 15 bis 42.	73
Abb. 28:	LDH-Werte im Verlauf der Mediumwechsel 1 bis 14.	74
Abb. 29:	LDH-Werte im Verlauf der Mediumwechsel 15 bis 42.	75
Abb. 30:	AP-Werte im Verlauf der Mediumwechsel 1 bis 14.	77
Abb. 31:	IL-1 β -Werte im Verlauf der Mediumwechsel 1 bis 14.	79
Abb. 32:	IL-6-Werte im Verlauf der Mediumwechsel 1 bis 14.	81

Abb. 33:	IL-6-Werte im Verlauf der Mediumwechsel 15 bis 42.	82
Abb. 34:	TNF α Werte im Verlauf der Mediumwechsel 1 bis 14.	84
Abb. 35:	IFN γ -Werte im Verlauf der Mediumwechsel 1 bis 14.	85
Abb. 36:	IFN γ -Werte im Verlauf der Mediumwechsel 15 bis 42.	86
Abb. 37:	Rasterelektronenmikroskopie der Kontrollkultur „nur Zellen“ nach 12 Wochen.	88
Abb. 38:	Rasterelektronenmikroskopie der Nullprobe eines „Telos“- Knochenplättchens.	89
Abb. 39 und 40:	Rasterelektronenmikroskopie der Zellkultur „Telos“ nach 12 Wochen,	90
Abb. 41 und 42:	Rasterelektronenmikroskopie der Nullprobe eines autologen Knochenplättchens,	91
Abb. 43 und 44:	Rasterelektronenmikroskopie der „autologen“ Knochenplättchen nach 12 Wochen	92
Abb. 45:	Giemsa-Färbung von „nur Zellen“ nach 12 Wochen.	93
Abb. 46:	Giemsa-Färbung von „Telos“ nach 12 Wochen.	94
Abb. 47:	Giemsa-Färbung von „Telos“ nach 12 Wochen.	94
Abb. 48:	Giemsa-Färbung von „Telos“ nach 12 Wochen.	95
Abb. 49:	Giemsa-Färbung eines „autologen“ Präparates nach 12 Wochen.	96
Abb. 50:	Giemsa-Färbung eines „autologen“ Präparates nach 12 Wochen.	96
Abb. 51:	Schnittbilder nach Technoviteinbettung.	97
Tab. 1:	Zurzeit klinisch verfügbare Materialien für den Knochenersatz.	8
Tab. 2:	pH-Werte im Mediumüberstand.	60
Tab. 3:	Ergebnisse der Trypanfärbung nach 12 Wochen Zellkultur.	62
Tab. 4:	Gesamtzellzahl im abgenommenen Mediumüberstand (3 ml).	67
Tab. 5:	Anzahl der Zellen im Mediumüberstand (3 ml) >6,25 μ m = vital.	68
Tab. 6:	Anzahl der Zellen im Mediumüberstand (3 ml) <6,25 μ m = avital.	68
Tab. 7:	Lactat-Werte im Verkauf der Mediumwechsel 1 bis 14.	71
Tab. 8:	Lactat-Werte im Verkauf der Mediumwechsel 15 bis 42.	72
Tab. 9:	LDH-Werte im Verkauf der Mediumwechsel 1 bis 14.	74
Tab. 10:	LDH-Werte im Verkauf der Mediumwechsel 15 bis 42.	75
Tab. 11:	AP-Werte im Verkauf der Mediumwechsel 1 bis 14.	76
Tab. 12:	AP-Werte im Verkauf der Mediumwechsel 15 bis 42.	77

Tab. 13:	IL-1 β -Werte im Verkauf der Mediumwechsel 1 bis 14.	79
Tab. 14:	IL-1 β -Werte im Verkauf der Mediumwechsel 15 bis 42.	80
Tab. 15:	IL-6 Werte im Verkauf der Mediumwechsel 1 bis 14.	81
Tab. 16:	IL-6-Werte im Verkauf der Mediumwechsel 15 bis 42.	82
Tab. 17:	TNF α Werte im Verkauf der Mediumwechsel 1 bis 14.	83
Tab. 18:	TNF α Werte im Verkauf der Mediumwechsel 15 bis 42.	84
Tab. 19:	IFN γ -Werte im Verkauf der Mediumwechsel 1 bis 14.	85
Tab. 20:	IFN γ -Werte im Verkauf der Mediumwechsel 15 bis 42.	86

VII.3 Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name:	Christoph Albin Ludwig Herzberger
Adresse:	Dunantstraße 7, 79110 Freiburg
Geburtsdatum:	19.04.1980
Geburtsort:	Eutin
Familienstand:	ledig

Schulbildung

1986 – 1990	Grundschule Neuenbrunslar
1990 – 1999	Friedrichsgymnasium Kassel
08/1996 – 01/1997	Besuch der Narragansett Regional High School, Templeton, USA
Juni 1999	Abitur

Wehrdienst

07/1999 – 06/2000	Wehrdienst bei der Deutschen Marine
-------------------	-------------------------------------

Studium

WS 2000/01 – SS 2007	Studium der Humanmedizin, Philipps Universität Marburg
2002	Physikum
2003	Erstes Staatsexamen

Famulaturen:

Februar 2003	Famulatur in der Abteilung Unfallchirurgie, Universitätsklinik Marburg
März 2004	Famulatur in der Abteilung Anästhesie, Universitätsklinik Marburg
August 2004	Famulatur in der Abteilung Unfallchirurgie, Universitätsklinik Marburg
September 2004	Famulatur in einer Allgemeinarztpraxis in Felsberg

2005 Zweites Staatsexamen

Praktisches Jahr:

04/2007 – 08/2007 Karl Bremer Hospital, Kapstadt/ Südafrika (Innere Medizin)

08/2007 – 12/2007 Zentrum für Chirurgie, Marburg

12/2007 – 04/2008 Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Marburg

14.06.2007 Drittes Staatsexamen
Approbation als Arzt

Berufliche Tätigkeit

Seit 15.09.2007 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg,
Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. U. T. Hopt.

Wissenschaftliche Ausbildung

Promotion bei Prof. Dr. Dr. A. Wilke, Institut für Experimentelle Orthopädie und Biomechanik der Philipps-Universität Marburg,
Leitung: Prof. Dr. David Jones

VII.4 Publikationen

Poster auf dem Kongress der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie und Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie 2005

Endres S, Kratz M, Heinz M, Herzberger C, Reichel S, Garrel vT, Gotzen L, Wilke A (2005),

Biocompatibility testing of different sterilised or disinfected allogeneous bone grafts in comparison to the gold standard of autologous bone grafts – an „in vitro“ analysis of immunomodulation.

Zeitschrift für Orthopädie und Ihre Grenzgebiete 143(6): 660 – 668.

VII.5 Verzeichnis der Akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren Damen / Herren in Marburg

Arnold, Aumüller, Barth, Bartsch, Basler, Baum, Beyer, Christiansen, Christ, Czubayko, Daut, Doss, Engelhart-Cabilic, Feuser, Fruhstorfer, Gemsa, Geus, Görg, Gotzen, Gressner, Grimm, Griss, Grzeschik, Happle, Hasilik, Hellinger, Herzum, Hesse, Hofmann, Jungclas, Katschinski, Kern, Kienapfel, Klenk, Klose, Köhler, Koolmann, Kretschmer, Krieg, Lammel, Lang, Lengsfeld, Lippert, Maisch, Moll, Moosdorf, Mueller, Neubauer, Oertel, Pfeiffer, Radsak, Renz, Richter, Röhm, Rogausch, Rosenow, Roth-Dobbelstein, Rothmund, Reichhardt, Remschmidt, Schachtschabel, Schäfer, Schlenzka, Schmidt, Schnabel, Schneyer, Seifart, Seitz, Simon, Steiniger, Stief, Stinner, Vogelmeier, Vohland, Voigt, Weihe, Westermann, Werner, Westphal, Wilke, Wirth, Zielke.

VII.6 Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

**Vergleichende in vitro – Analyse
von allogenen Knochentransplantaten
- Telos versus autolog -**

an dem Institut für Experimentelle Orthopädie und Biomechanik der Philipps-Universität Marburg, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. physiol. Axel Wilke ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Freiburg, 2009

VII.7 Danksagung

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2004 bis August 2007 im Labor für experimentelle Orthopädie der Philipps – Universität Marburg angefertigt.

Bedanken möchte ich mich zuerst bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Dr. Axel Wilke, der mir bei der Anfertigung dieser Arbeit stets mit viel Geduld die nötige Unterstützung und Hilfestellung gewährte.

In diesem Zusammenhang danke ich auch besonders meinem Betreuer Dr. Stefan Endres, dessen konstruktive Kritik und geduldige Anleitung im Labor maßgeblich zur Fertigstellung beitrug.

Weiterer Dank gilt Frau Marita Kratz, MTA und Leiterin des Labors für experimentelle Orthopädie, sowie Sabrina Reichel und Martin Heinz, Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe. Ohne ihre Unterstützung und kollegialen Gespräche wäre die Fertigstellung dieser Arbeit wohl kaum möglich gewesen.

Ein weiterer Dank gebührt all den Freunden, die mir in der Zeit der Erstellung dieser Arbeit zur Seite gestanden haben und immer für mich da waren, wenn ich sie gebraucht habe.

Nicht zuletzt bin ich meinen Eltern und meiner Familie für ihre unermüdliche und selbstlose Unterstützung während des gesamten Studiums zu größtem Dank verpflichtet.

Für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit danke ich der Endoklinik Hamburg.